GENÜBERTRAGUNG ZWISCHEN ISOLATEN VON BACILLUS THURINGIENSIS DURCH PROTOPLASTENTRANSFORMATION UND -FUSION

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

Dietmar Schall
aus Kiebingen

1986

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543928_0120

GENÜBERTRAGUNG ZWISCHEN ISOLATEN VON BACILLUS THURINGIENSIS DURCH PROTOPLASTENTRANSFORMATION UND -FUSION

Dissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Biologie
der Eberhard-Karls-Universität Tübingen

vorgelegt von

Dietmar Schall
aus Kiebingen

1987

Tag der mündlichen Prüfung: 17. Dezember 1986

Dekan	: Prof. Dr. W. Engels
1. Berichterstatter	: Prof. Dr. H. Zähner
2. Berichterstatter	: Prof. Dr. H. Wolf

Die vorliegende Arbeit wurde unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Zähner und Herrn Dr. K. Bernhard am Lehrstuhl Mikrobiologie I, Institut für Biologie II, der Universität Tübingen angefertigt.

Für die Überlassung des Themas und des Arbeitsplatzes danke ich Herrn Prof. Dr. H. Zähner.

Bei Herrn Dr. K. Bernhard möchte ich mich für die Betreuung und ständige Diskussionsbereitschaft bedanken.

Christine Wondrak danke ich für die vielen praktischen Hilfen bei der Durchführung dieser Arbeit

Herrn Wusch danke ich für die Anfertigung der Zeichnungen

Allen Mitarbeitern der Lehrstühle Mikrobiologie I und II, vor allen den Kollegen des B.t.-Arbeitskreises, danke ich für das gute Arbeitsklima.

Im Text werden folgende Abkürzungen verwendet:

B.c.	Bacillus cereus
B.t.	Bacillus thuringiensis
Cm	Chloramphenicol
cry	Kristall
EDTA	Ethylendiaminotetraessigsäure
h	Stunden
Md	Mega-Dalton
min	Minute
mM	millimolar
MOPS	Morpholino-propan-sulfonsäure
nd	nicht bestimmt
nic	Nicotinamid
nm	Nanometer
OD	optische Dichte
pur	Adenin + Guanin
SDS	Natrium-Dodecylsulfat
spo	Sporulation
Str	Streptomycin
t	Zeit
Tm	Tetracyclin
Tris	Tris-hydroxymethyl-aminomethan
Upm	Umdrehungen pro Minute

Für Aminosäuren wurden die geläufigen Standardabkürzungen verwendet.

I N H A L T S V E R Z E I C H N I S

		Seite
1.	EINLEITUNG	1
2.	MATERIAL UND METHODEN	7
2.1.	Chemikalien	7
2.2.	Nährmedien, Puffer und Lösungen	8
2.2.1.	Konzentrationen der Supplemente in den Medien	9
2.2.2.	Protoplastierungspuffer	10
2.2.3.	Regenerationsmedium für Bacillus subtilis	10
2.2.4.	Regenerationsmedium für Bacillus thuringiensis	11
2.3.	Organismen	11
2.3.1.	Ausgangsstämme	11
2.3.2.	Aufbewahrung der Stämme	11
2.3.3.	Anzucht der Zellen in Submerskultur	13
2.3.4.	Anzucht der Zellen zur Protoplastierung	13
2.4.	Messung der Protoplastierung	13
2.5.	Messung der Regeneration	14
2.6.	Protoplastentransformation	15
2.6.1.	Protoplastierung	15
2.6.2.	Transformation	15
2.7.	Protoplastenfusion	16
2.7.1.	Fusion von B.thuringiensis und B.cereus	16
2.7.2.	Fusion von B.thuringiensis und B.subtilis zur Übertragung von Resistenzplasmiden	16
2.8.	Plasmidübertragung durch direkten Zellkontakt	17
2.9.	Isolierung und Charakterisierung von Plasmid DNA	17
2.9.1.	Isolierung von Resistenzplasmiden aus aus B.subtilis	17
2.9.2.	Isolierung von Plasmiden aus B.thuringiensis	18
2.9.3.	Cell-Ethidiumbromid-Dichtezentrifugation	18
2.9.4.	Bestimmung von DNA-Konzentrationen	19
2.9.5.	Agarose-Gelelektrophorese	19

Seite

3.	ERGEBNISSE	21
3.1.	Protoplastierung	21
3.1.1.	Protoplastierung durch Autolyse (STML)	21
3.1.2.	Optimierung der Anzuchtbedingungen für die Autolyse	22
3.1.2.1.	Anzuchtmedium	22
3.1.2.2.	Belüftung	23
3.1.3.	Unterscheidung von Enzymwirkung, Autolyse und osmotischem Schock	24
3.1.4.	Protoplastierung ohne Autolysewirkung	26
3.1.4.1.	Lysozym (MML)	27
3.1.4.2.	Mutanolysin und Lysozym (SMMP M/L)	27
3.1.5.	Protoplastierbarkeit von verschiedenen Stämmen	29
3.2.	Regeneration	30
3.2.1.	Regenerationsmedium	30
3.2.2.	Unterschiedliche Protoplastierungsmethoden	31
3.2.3.	Regeneration von verschiedenen Stämmen	32
3.3.	Transformation	33
3.3.1.	Direkte Selektion von Transformanten	33
3.3.2.	Isolierung von DNA für Transformationsversuche	34
3.3.3.	Erste Versuche zur direkten Selektion	35
3.3.4.	Chloramphenicoleffekt	36
3.3.5.	Protoplastierungsmethode	36
3.3.6.	Kontrollversuche	37
3.3.7.	Optimierung der Protoplastentransformation	38
3.3.7.1.	Zelldichte	38
3.3.7.2.	Inkubationszeit mit PEG	40
3.3.7.3.	PEG-Konzentration	40
3.3.7.4.	Molekulargewicht PEG	41
3.3.7.5.	Induktion der Antibiotikaresistenz	42
3.3.7.6.	Plasmidkonzentration	44
3.3.8.	Transformation von verschiedenen Stämmen	45
3.3.9.	Nachweis von Plasmid-DNA in transformierten Stämmen durch Agarose-Gelelektrophorese	46

Seite

3.4. Fusion 47
3.4.1. Erste Versuche zur Protoplasten-fusion von Bacillus thuringiensis 47
3.4.2. Selektionssystem zum Nachweis von Plasmid-übertragung und Rekombination 49
3.4.3. Versuch der direkten Selektion 50
3.4.4. Fusionen mit Mutanten des gleichen Ausgangsstammes 51
3.4.5. Fusion von verschiedenen Ausgangsstämmen 53
3.4.5.1. Fusionen mit HD-2 D6-4 als Rezipient 53
3.4.5.2. Fusionen mit B.cereus UM7-1 als Rezipient 58
3.4.5.3. Versuche zur Fusion von B.t.israelensis 60

4. DISKUSSION 61
4.1. Protoplastierung und Regeneration 61
4.2. Transformation 64
4.3. Fusion 67
4.4. Ausblick 69

5. ZUSAMMENFASSUNG 71

6. LITERATUR 72

1. EINLEITUNG

Bacillus thuringiensis ist der bisher am erfolgreichsten eingesetzte Mikroorganismus zur biologischen Kontrolle von Insekten (Lüthy und Wolfersberger 1986). Präparate von B.thuringiensis sind schon seit 1960 (USA) bzw. 1964 (BRD) zugelassen (Krieg 1983), und werden seither in steigendem Maße zur Bekämpfung von Schadschmetterlingen im Pflanzenschutz eingesetzt. Mit B.thuringiensis var. israelensis wurde 1977 von Goldberg und Margalit ein gegen Stechmücken und Kriebelmücken wirksamer B.t.-Stamm isoliert. Mit diesem Isolat war zum ersten Mal der Einsatz von B.t. zur Vektorbekämpfung möglich (Davidson und Sweeney 1983). Die Entdeckung des gegen Käferlarven wirksamen B.thuringiensis var. tenebrionis (Krieg et al. 1983) hat das Anwendungsspektrum von B.t. schließlich nochmals erweitert.

Bacillus Arten bilden bei ungünstigen Umweltbedingungen hitze- und austrocknungsresistente Überdauerungsstadien (Endosporen). Bacillus thuringiensis bildet aber während der Sporulation zusätzlich einen im Lichtmikroskop deutlich sichtbaren parasporalen Einschlußkörper, der auf Grund seines kristallähnlichen Aufbaus vereinfacht als Kristall bezeichnet wird. Diese Proteinkristalle sind für die Toxizität von B.t. verantwortlich (Angus 1954). Sie lösen sich nach oraler Aufnahme im alkalischen Milieu des Darms der Zielinsekten auf. Durch die Wirkung von Darmproteasen (Tojo et al. 1985) bzw. kristallassoziierten Proteasen (Turley et al. 1985) entstehen dabei noch nicht genau bekannte toxische Spaltprodukte (Delta-Endotoxine), die schließlich zur Lyse von Darmepithelzellen führen. Der molekulare Mechanismus der Delta-Endotoxinwirkung ist noch nicht genau bekannt.

Die heute übliche Klassifizierung der vielen isolierten B.t.-Stämme erfolgt durch Vergleich der Flagellen-Antigene (De Barjac und Bonnefoi 1973; De Barjac 1981). Danach lassen sich bis heute 22 H-Antigen Gruppen unterscheiden. Außerdem werden die Stämme auch auf Grund ihres Wirkungsspektrums in Pathotypen eingeteilt. Mehr als 95% der bisher gefundenen B.t.-Isolate bilden rhombische Kristalle und sind gegen Schmetterlingslarven wirksam (Pathotyp A). Im Pathotyp B sind Varietäten mit Aktivität gegen Stechmückenlarven und rundlichen, unregelmäßigen Kristallen und im Pathotyp C Stämme mit Aktivität gegen Käferlarven und plättchenförmigen Kristallen zusammengefaßt. Für einige kristallbildende B.t.-Unterarten (z.B. tochigiensis, kumantoensis) ist keine insektizide Wirkung bekannt (Pathotyp ND). Außerdem sind auch schmetterlingspathogene Stämme beschrieben worden, die eine geringe mosquitozide Aktivität besitzen. Diese Isolate bilden neben dem lepidopteren-spezifischen Kristall (Protein P1: Molekulargewicht ca. 130 000) noch einen kleinen ovalen Einschlußkörper (Protein P2: Molekulargewicht ca. 65 000), der eine schwache Wirkung gegen Schmetterlinge und Stechmücken besitzt (Iizuka und Yamamoto 1983).
Serotyp und Pathotyp sind nicht korrelierbar. So sind z.B. Pathotyp A,B und C Stämme mit den selben Flagellen-Antigenen (H8) isoliert worden.

In allen B.t.-Stämmen sind 2 bis 12 Plasmide mit Molekulargewichten zwischen 1,5 und >150 Md nachweißbar (Carlton und Gonzalez 1985a). Curingversuche (Gonzalez et al. 1981), Kreuzungsversuche (Gonzalez et al. 1982) und Klonierungsversuche (Mc Linden et al. 1985) haben gezeigt, daß die Fähigkeit zur Kristallbildung in vielen Stämmen plasmiddeterminiert ist. Dabei können die beteiligten Gene auf einem oder mehreren Plasmiden (30 - 150 Md) liegen. Hybridisierungsversuche mit klonierten Kristallgenen ergaben eine große Ähnlichkeit der Delta-Endotoxin-Gene innerhalb der Pathotyp A Gruppe (Lereclus et al. 1982; Kronstad et al. 1983). Durch

Klonierung eines Delta-Endotoxin-Gens können weitere Kristallgene desselben Pathotyps daher sehr einfach durch Hybridisierung mit der spezifischen Probe gefunden werden. Auf diese Weise konnten z.B. mindestens 3 Delta-Endotoxin-Gene in B.t.kurstaki HD-1 nachgewiesen werden. (Kronstad und Whiteley 1986).
Die Funktion der meisten Plasmide in B.t. ist unbekannt. Außer den Kristallproteingenen sind erst zwei weitere plasmidcodierte Eigenschaften beschrieben worden. Tam und Fitz-James (1986) konnten die Bildung von phagenartigen Partikeln in B.t.israelensis einem 68 Md Plasmid zuordnen. Diese Partikel werden auch während der Sporulation gebildet und sind neben dem Delta-Endotoxin-Kristall als weiterer kleiner Einschlußkörper sichtbar. Schließlich war von Ozawa und Iwahana (1986) die Kopplung der Kristallbildung und der ß-Exotoxinbildung (Sebesta et al. 1981) an ein 62 Md-Plasmid in B.t.darmstadiensis nachweisbar.

B.thuringiensis Stämme sind physiologisch nicht von B.cereus unterscheidbar (Baumann et al. 1984). In B.cereus Stämmen, die aus Bodenproben isoliert wurden, konnten alle bisher bei B.t. charakterisierten H-Antigene gefunden werden (Ohba und Aizawa 1986). Der einzige Unterschied zwischen B.thuringiensis und B.cereus ist daher die Bildung des Delta-Endotoxin-Kristalls während der Sporulation. Diese Eigenschaft kann aber durch Plasmicuring leicht verloren gehen. Bacillus thuringiensis muß somit als Varietät von Bacillus cereus angesehen werden.

Die Wirkungsspektren verschiedener Stämme sind auch innerhalb desselben Pathotyps sehr unterschiedlich (Krieg und Langenbruch 1981). Für eine optimale Insektenbekämpfung ist deshalb der Einsatz von verschiedenen B.t.-Stämmen sinnvoll. Da die Wachstumseigenschaften von verschiedenen B.t.-Varietäten sehr unterschiedlich sind, ist für jeden Stamm eine eigene Fermentationsoptimierung notwendig. Dies scheiterte

bisher an den dafür erforderlichen hohen Kosten. Eine Möglichkeit, diese Situation zu verbessern, wäre die Verwendung eines Produktionsstammes, in den dann je nach Bedarf die genetische Information zur Bildung von verschiedenen Delta-Endotoxinen eingeführt wird.Der Transfer von Kristallplasmiden war bisher nur durch den von Gonzalez et al. (1982) entdeckten konjugationsähnlichen Mechanismus möglich. Mit dieser Methode konnten Plasmide von schmetterlingsaktiven Stämmen mit hoher Rate (bis 80%) in cry$^-$ Stämme, sogar in B.cereus übertragen werden. Die Übertragung von Plasmiden ist aber stark von den Kreuzungspartnern abhängig. Nur in bestimmten Kreuzungen war eine Übertragung der Kristallbildung nachweisbar.

Eine molekulargenetische Bearbeitung der Delta-Endotoxine wird dadurch erleichtert, daß die beteiligten Gene in der Regel auf Plasmiden lokalisiert sind. Es sind schon mehrere Kristallgene in E.coli oder B.subtilis kloniert und sequenziert worden (Schnepf und Whiteley 1981; Held et al. 1982; Klier et al. 1982; Shibano et al. 1985; Schnepf et al. 1985; Adang et al. 1985). Charakteristisch für die Delta-Endotoxin Produktion in B.t. ist die hohe Expression (bis 30% der sporulierten Zelle). In E.coli bzw. B.subtilis ist die Expression mit klonierten Genen bedeutend schlechter. Dies ist z.B. durch unterschiedliche Regulationsmechanismen in diesen Organismen erklärbar. Um diese Probleme auszuschließen, wäre die Untersuchung der Delta-Endotoxine direkt in B.thuringiensis oder B.cereus wünschenswert. Da keine geeignete Transformationsmethode in B.t. vorhanden war, konnten solche Versuche bisher nicht durchgeführt werden (Carlton und Gonzalez 1985b; Aronson et al 1986).

Das Ziel dieser Arbeit war die Entwicklung eines effizienten Transformationssystems, mit dem möglichst alle Bacillus thuringiensis und Bacillus cereus Stämme transformiert werden können. Eine Möglichkeit, bei fehlender natürlicher Kompetenz eine Aufnahme von DNA zu induzieren, ist die

Protoplastentransformation (Bibb et al. 1978). Diese Methode war die Grundlage der durchgeführten Transformationsversuche. Die Protoplastentransformation wurde aus der Protoplastenfusion (Schaeffer et al. 1976; Fodor und Alföldi 1976) entwickelt. Bei der Zellfusion wird durch das Verschmelzen der Zellmembranen eine Kombination der Zellinhalte beider Elternstämme erreicht. Eine Rekombination von Genen und eine Neuverteilung von Plasmiden ist bei dieser genetischen Methode daher sehr wahrscheinlich. Deshalb sollte auch die Protoplastenfusion auf ihre Eignung zur Stammentwicklung und Übertragung der Kristallbildung untersucht werden.

Die Methoden der Protoplastentransformation und Fusion sind in Abb.1 vereinfacht dargestellt. Um eine Protoplastierung der Zellen zu erreichen, muß zuerst die Zellwand abgebaut werden. Dies wird in den meisten Bakterien durch Inkubation der Zellen in einem osmotisch stabilisierten Puffer mit Lysozym erreicht. Eine Transformation bzw. Fusion wird durch hohe Konzentrationen an Polyethylenglykoll induziert. Die Wirkung des Polyethylenglykolls ist dabei nicht genau bekannt. Nach der eigentlichen Transformation oder Fusion muß von den Protoplasten wieder eine intakte Zellwand aufgebaut werden (Regeneration). Ein wichtiger Schritt ist die Selektion von transformierten bzw. fusionierten Klonen. Dazu gibt es zwei Möglichkeiten: Bei der indirekten Selektion werden die Protoplasten zuerst auf einem geeigneten Medium regeneriert. Anschließend erfolgt die Selektion, z.B. durch das Überstempeln auf ein Selektionsmedium. Vorteilhafter ist die direkte Selektion. Hier können durch die Wahl von geeigneten Bedingungen nur selektierte Kolonien auf dem Regenerationsmedium wachsen.

Abb.1: Schematischer Ablauf der Protoplastentransformation und Protoplastenfusion.

2. MATERIAL UND METHODEN

2.1. Chemikalien

Mit Ausnahme der hier aufgeführten Substanzen wurden analysenreine Chemikalien der Firma Merck, Darmstadt verwendet.

Bethesda Research Laboratories	Agarose
Fa. Carròux, Hamburg	Agar für komplexe Medien
Difco Laboratories, Detroit, USA	Antibiotic Medium 3 Bacto Agar Bacto Yeast Extract Casamino acids
Merck AG, Darmstadt	Caseinpepton
Oxoid Deutschland, Wesel	Peptonized Milk Yeast Extract
Serva Feinbiochemica, Heidelberg	Bromphenolblau Ethidiumbromid Lysozym MOPS Na_2-succinat Polyethylenglykoll Ribonuclease aus Rinderpankreas Rinderserumalbumin
Sigma Chemie, Taufkirchen	Chloramphenicol Mutanolysin Tetracyclin

2.2. Nährmedien, Puffer und Lösungen

Die Medien wurden nach Einstellen des pH-Wertes mit NaOH bzw. HCl 20 min bei 120° C autoklaviert. Die Gewichtsangaben beziehen sich jeweils auf 1 l Wasser. Bei chemisch definierten Medien wurde entionisiertes Wasser verwendet. Wenn nicht anders angegeben, wurden den Festmedien 1,5% Agar zugegeben.

1) HGP - Medium

10 g	Caseinpepton
5 g	Hefeextrakt
5 g	Glucose
5 g	NaCl
10 ml	Spurenelemente
	pH 7,0

2) AP - Medium

10 g	Peptonized Milk
5 g	Difco Hefeextrakt
5 g	NaCl
1 g	Glucose
	pH 7,4

3) Minimalmedien

M1: Grundmedium (nach Nickerson und Bulla 1974)

$MgSO_4 \times 7H_2O$	0,3 g
K_2HPO_4	0,5 g
$(NH_4)_2SO_4$	2 g
Na_3-citrat $\times 2H_2O$	2 g
Glucose	5 g
Spurenelemente	10 ml
pH 7,4	

M2: M1 mit 1 g/l Casaminoacids

M3: M1 mit 1 g/l Glutaminsäure

M4: M1 mit folgenden Aminosäuren: Ala, Gly, Ser, Glu, Gln, Asp, Asn, Ile, Leu, Val, Pro, Tyr, Phe.

4) Spurenelementelösung für Bacillus thuringiensis

$CaCl_2 \times 2H_2O$	8 g
$MnCl_2 \times 4H_2O$	5 g
$ZnCl_2$	0,5 g
CuCl	0,5 g
$FeCl_3 \times 6H_2O$	0,5 g
Na_3-citrat x $2H_2O$	10 g

mit entionisiertem Wasser ad 1 000 ml

5) SSC - Puffer

150 mM NaCl
15 mM Na_3-citrat
pH 7,0

6) TES - Puffer

20 mM Tris
5 mM EDTA
100 mM NaCl
pH 7,5

2.2.1. Konzentrationen der Supplemente in den Medien

Aminosäuren	100 ug/ml
Purine und Pyrimidine	20 ug/ml
Vitamine	2 ug/ml
Streptomycin	100 ug/ml
Chloramphenicol	10 ug/ml
Tetracyclin	15 ug/ml

Aminosäuren, Purine, Pyrimidine und Vitamine wurden mit den Medien sterilisiert. Die Antibiotika wurden nach dem Autoklavieren steril zugegeben.

2.2.2. Protoplastierungspuffer

1) STM: 0,5 M Saccharose, 30 mM Tris, 5 mM $MgCl_2 \times 6H_2O$ pH 8,0

2) STML: STM mit 0,5 mg/ml Lysozym

3) SMM: 0,5 M Saccharose, 20 mM Na_2-maleat, 20 mM $MgCl_2$ pH 6,5.

4) MM: 20 mM Na_2-maleat, 20 mM $MgCl_2$; pH 6,5

5) MML: MM mit 5 mg/ml Lysozym

6) SMMP: Gleiche Volumen an 2xSMM und 4xAntibiotic Medium 3 wurden nach dem Autoklavieren zusammengegeben.

7) SMMP M/L: SMMP mit 1000 U/ml Mutanolysin und 1 mg/ml Lysozym

2.2.3. Regenerationsmedium für Bacillus subtilis (DM-3)

Agar (4 %)	200 ml
Na_2-succinat (1 M pH 7,3)	500 ml
Casamino acids (5 %)	100 ml
Hefeextrakt (10 %)	50 ml
K_2HPO_4 (3,5 %) + KH_2PO_4 (1,5 %)	100 ml
Glucose (20 %)	25 ml
$MgCl_2 \times 6H_2O$ (1 M)	20 ml
Rinderserumalbumin (2 %)	5 ml

Alle Bestandteile wurden getrennt autoklaviert. Rinderserumalbumin wurde steril filtriert.

2.2.4. Regenerationsmedium für Bacillus thuringiensis (R)

Caseinpepton	10 g
Hefeextrakt	5 g
Glucose	5 g
NaCl	2 g
Na-citrat	2 g
$MgCl_2 \times 6H_2O$	0,5 g
$CaCl_2 \times 2H_2O$	0,4 g
Saccharose	340 g
pH 7,0	
Gelatine	25 g
Stärke	15 g
Agar	25 g

RCl: R mit 1 ug/ml Chloramphenicol

RC2: R mit 2 ug/ml Chloramphenicol

RTCl: R mit 15 ug/ml Tetracyclin und 1 ug/ml Chloramphenicol

2.3. Organismen

2.3.1. Ausgangsstämme

Die in dieser Arbeit verwendeten Ausgangstämme sind in der Tabelle 1 dargestellt.

2.3.2. Aufbewahrung der Stämme

Die Stämme wurden mit der Impföse auf HGP-Platten oder Schrägagarröhrchen überführt, bis zur Sporulation inkubiert, und anschließend bei 4°C aufbewahrt.

Tab.1: Ausgangsstämme

Stamm	Varietät	Serotyp	Pathotyp	Phenotyp[a]	Herkunft[b]
B.subtilis					
DSM 402	-	-	-	trp^-	1
B.cereus					
DSM 31	-	-	-	-	1
DSM 351	-	-	-	-	1
NRRL 569 UM10	-	-	-	trp^-	2
NRRL 569 UM7-1	-	-	-	his^-, Str^r	3
B.thuringiensis					
BI 256-82	tenebrionis	8	C	his^-	4
60A	israelensis	14	B	-	5
PG-14	morrisoni	8	B	nd	4
VIII/84	morrisoni	8	A	-	4
VII/73	aizawai	7	A	nd	4
HD-8 pC194	galleriae	5	A	nic^-, Cm^r	6
HD-1	kurstaki	3	A	-	7
HD-73 30	kurstaki	3	A	arg^-	6
HD-2 pC194	thuringiensis	1	A	Cm^r	6
HD-2 D6				met^-, Tc^r	3
HD-2 D10				pur^-, Tc^r	3
HD-2 D11				lys^-, Tc^r	3
HD-2 D12				arg^-, Tc^r	3

[a] Tetracyclin- und Chloramphenicolresistenzsindplasmid-codierte Eigenschaften (Plasmide pBC16 und pC194).

[b] Herkunft der Stämme: 1: Deutsche Sammlung für Mikroorganismen, Göttingen; 2: C.Thorne, Department of Microbiology, University of Massachusetts, USA; 3: Diplomarbeit (Schall 1984); 4: A.Krieg, BBA, Institut für Biologische Schädlingsbekämpfung, Darmstadt; 5: W.Schnetter, Zoologisches Institut, Universität Heidelberg; 6: K.Bernhard, Mikrobiologie I, Universität Tübingen; 7: C.Carlton, Ecogen Inc., Langhorne, USA.

2.3.3. Anzucht der Zellen in Submerskultur

B.thuringiensis und B.cereus wurden immer bei 27°C, B.subtilis bei 37°C angezogen. Als Kulturgefäße dienten 100 bzw. 500 ml Erlenmeyerkolben mit einem seitlichen Einstich. Die 100 ml Kolben wurden mit 20 ml HGP-Medium gefüllt und nach Animpfen bei 100 Upm in einem Schüttelwasserbad (Typ HP Infors AG, Basel) inkubiert. 500 ml Gefäße mit 100-250 ml Medium wurden auf einer rotierenden Schüttelmaschine (Typ RC 106 Infors AG, Basel; Auslenkradius 25 mm; Drehzahl 120 Upm) inkubiert.

2.3.4. Anzucht der Zellen zur Protoplastierung

a) Protoplastierung durch Autolyse:
Mit vegetativen Zellen wurden 20 ml HGP angeimpft und 16 h bebrütet. 1 ml dieser Kultur wurde dann zu 100 ml AP-Medium gegeben und 5-6 h bis zur Autolysephase inkubiert.

b) Protoplastierung mit Mutanolysin/Lysozym und Lysozym:
Für diese Versuche wurden Übernachtkulturen (16h) in 20 ml HGP verwendet.

2.4. Messung der Protoplastierung

Für die Protoplastierung ist nicht nur der Abbau der Zellwand notwendig, sondern es müssen auch Bedingungen gefunden werden, unter denen stabile Protoplasten gebildet werden. Die Protoplastierung wurde deshalb zuerst im Phasenkontrast-Mikroskop überprüft. Um die genaue Protoplastierungsrate zu messen, wurden die Zellen nach der Protoplastierung in SSC gewaschen, verdünnt und auf HGP-Platten ausgesät. Außerdem wurde die Gesamtzellzahl durch Auszählen in einer Neubauer-Zählkammer (Tiefe 0,2 mm) bestimmt. Zur Messung der Protoplastierung dienten zwei Angaben:

$$\text{a) Protoplastierungsrate} = \frac{\text{Zellzahl auf HGP-Medium}}{\text{Gesamtzellzahl}}$$

b) Protoplastierung (%) = (1 - Protoplastierungsrate) x 100

Die Protoplastierungsrate (a) gibt den Anteil an nicht-protoplastierten Zellen an. Dieser Wert wurde nur bei hohen Protoplastierungsraten verwendet. Bei einer geringen Protoplastierung wurde direkt der Anteil an Protoplasten angegeben (b).

2.5. Messung der Regeneration

Die Regeneration von Protoplasten wurde direkt durch den Vergleich der Lebendzellzahlen auf Regenerationsplatten (Wachstum von nicht-protoplastierten Zellen und regenerierten Protoplasten) und Kontrollplatten (Wachstum von nicht-protoplastierten Zellen) gemessen. Die Regenerationsrate wurde folgendermaßen definiert:

$$\text{Regenerationsrate} = \frac{(\text{Zellzahl } R^{1} - \text{Zellzahl HGP}^{2})}{\text{Gesamtzellzahl}^{3}}$$

[1] Regenerationsmedium: Wachstum von vegetativen Zellen und von regenerierten Protoplasten.

[2] Kontrollplatten: Wachstum von vegetativen Zellen.

[3] Die Gesamtzellzahl wurde durch Auszählen in einer Neubauer-Zählkammer bestimmt.

2.6. Protoplastentransformation

2.6.1. Protoplastierung

Zur Protoplastierung gibt es verschiedene Alternativen:

1) Autolyse: 5 ml einer AP Kultur wurden in der Autolysephase abzentrifugiert (10 min bei 5000 Upm in der Christ-Zentrifuge) und in 1 ml STML aufgenommen. Die Zellen wurden 1,5 h bei 27° C inkubiert, anschließend wurden 1 ml SMMP zugegeben und weitere 30 min bebrütet.
2) Mutanolysin/Lysozym: 5 ml einer HGP Übernachtkultur wurden abzentrifugiert, in 1 ml SMMP M/L resuspendiert und zur Protoplastierung 2 h bei 27° C inkubiert.
3) Lysozym: 5 ml einer Übernachtkultur wurden abzentrifugiert, in 1 ml MML aufgenommen und 1,5 h bei 27° C inkubiert. Nach Zugabe von 0,5 ml 2xSMM wurde 15 min inkubiert, wieder 0,5 ml 2xSMM zugegeben und 15 min bebrütet. Dann wurden 2 ml SMMP zugegeben und weitere 30 min bei 27° C inkubiert.

2.6.2. Transformation

Die Protoplastensuspension wurde zweimal in SMMP gewaschen (10 min 4000 Upm) und in 0,5 ml SMMP resuspendiert. Für die Protoplastentransformation wurde folgender Ansatz verwendet:

0,2 ml Protoplastensuspension
10 ul Plasmid DNA
0,3 ml 50 % PEG 6000 in SMM

Nach einer Inkubation von 5 min bei Raumtemperatur wurden 5 ml SMMP zugegeben, die Protoplasten wurden 10 min bei 4000 Upm abzentrifugiert und in 1,5 ml SMMP resuspendiert. Anschließend wurden die Zellen 5 h bei 27° C inkubiert und nach Verdünnen in SMMP auf Regenerationsplatten ausgesät, die geeignete Konzentrationen an Antibiotika enthielten.

2.7. Protoplastenfusion

2.7.1. Fusion von B.thuringiensis und B.cereus

Je 5 ml der beiden Elternstämme wurden in der Autolysephase abzentrifugiert (10 min 5000 Upm Christ-Zentrifuge) und in je 1ml STML resuspendiert. Nach 2 h Inkubation bei 27° C wurden die Protoplastensuspensionen beider Stämme zusammengegeben, 10 min bei 4000 Upm abzentrifugiert und in 0,5 ml SMM resuspendiert. Zur Fusion wurden 0,2 ml Protoplastensuspension mit 1,8 ml 40 % PEG 6000 in SMM (Endkonzentration 36 % PEG) gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Dann wurden 5 ml SMM hinzugegeben, die Protoplasten wurden 10 min bei 4000 Upm abzentrifugiert und in 1 ml SMM aufgenommen. Je 0,1 ml der Suspension wurden nach Verdünnen in SMM auf Regenerationsmedium plattiert. Die Platten wurden 5-6 Tage bei 27° C bebrütet und anschließend auf Selektionsplatten überstempelt. Die auf diesen Platten wachsenden Kolonien wurden geklont und weiter charakterisiert.

2.7.2. Fusion von B.thuringiensis und B.subtilis zur Übertragung von Resistenzplasmiden

Die Fusionen wurden wie in 2.5.1. beschrieben durchgeführt, mit folgenden Unterschieden:
Die Protoplastierung von Bacillus subtilis erfolgte in SMMP mit 2 mg/ml Lysozym. Als Regenerationsmedium wurde DM-3 Agar verwendet. Auf diesem Medium regeneriert nur B.subtilis.

2.8. Plasmidübertragung durch direkten Zellkontakt (nach Gonzalez et al. 1982)

Die Kreuzungen wurden in kleinen Reagenzgläsern mit 2ml HGP durchgeführt. Übernachtkulturen (15-17 h) der Elternstämme wurden 1/100 verdünnt und 6-8 h inkubiert. Für Kreuzungsversuche wurden dann 20 ul von beiden Elternstämmen zusammen in 2 ml HGP für 18-24 h inkubiert. Die Zellen wurden mit SSC verdünnt und auf Selektionsplatten ausgesät.

2.9. Isolierung und Charakterisierung von Plasmid DNA

2.9.1. Isolierung von Resistenzplasmiden aus B.subtilis (nach Bernhard 1977)

Die Zellen einer Übernachtkultur (250 ml Antibiotic Medium 3 mit 10 ug/ml Antibiotikum) wurden 10 min bei 6000 Upm in der Sorvall-Zentrifuge abzentrifugiert, 2 mal mit TES-Puffer gewaschen und in 4 ml Lysozympuffer (30 mM Tris, 50 mM EDTA, 50 mM NaCl, 25 % Saccharose, pH 8,0 mit KOH) mit 500 ug/ml Lysozym resuspendiert. Nach 30 min Inkubation bei 37° C wurden 16 ml SDS-Puffer (2 ml 10 % SDS, 2 ml 0,5 M EDTA pH 8,0, 12 ml TES-Puffer) zugegeben und weitere 30 min bei 37° C inkubiert. Diese Lösung wurde nach Zugabe von 5 ml 5 M NaCl vorsichtig mit einem Glasstab gemischt, 20 h auf Eis gestellt und anschließend 30 min bei 15 000 Upm im SS34 Rotor abzentrifugiert. Der Überstand wurde in der Kälte mit 5 ml 50 % PEG 6000 in TES-Puffer gemischt, 5 h auf Eis gestellt und dann 10 min bei 10 000 Upm und 10° C abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 2 ml TES mit 200 ug/ml RNase gelöst, 30 min bei 65° C inkubiert, und nach Zugabe von 250 ul Ethidiumbromid-Stammlösung (10 mg/ml) mit TES auf ein Volumen von 4 ml aufgefüllt. Die weitere Plasmidaufarbeitung (Ultrazentrifugation) ist in 2.7.3. beschrieben.

2.9.2. Isolierung von Plasmiden aus B.thuringiensis/B.cereus (modifiziert nach Birnboim 1983)

100 ml einer AP-Kultur wurden in der Autolysephase 10 min bei 7000 Upm in der Sorvall-Zentrifuge abzentrifugiert und in 2 ml 25 mM Tris,15 % Saccharose, pH 8,0 mit 0,5 mg/ml Lysozym resuspendiert. Nach 30 - 60 min Inkubation bei 27° C (die Protoplastierung wurde im Phasenkontrastmikroskop überprüft) wurden 4 ml 0,2 N NaOH, 1 % SDS, 10 mM EDTA zugegeben, vorsichtig mit einem Glasstab bis zur Homogenität gemischt und 10 min auf Eis gestellt. Anschließend wurden 3 ml 3M K-Acetat, 1,8 M Ameisensäure hinzugegeben, die Suspension wurde sorgfältig durchmischt, 30 min auf Eis gestellt, und 10 min bei 10 000 Upm im SS34 Rotor abzentrifugiert. Der Überstand wurde in ein neues Zentrifugenröhrchen gegeben, mit 18 ml eiskaltem Ethanol versetzt und über Nacht bei -20° C aufbewahrt. Nach zehnminütiger Zentrifugation bei 10 000 Upm wurde der Überstand verworfen und der Niederschlag in 5 ml 0,1 M Na-acetat, 0,05 M MOPS, pH 8,0 gelöst. Diese Lösung wurde zweimal mit gleichem Volumen Phenol, gesättigt mit 100 mM Tris pH 8,0, extrahiert und die Wasserphase wurde schließlich zur Ausfällung der Plasmid DNA mit 2 Volumen eiskaltem Ethanol versetzt und über Nacht bei -20° C aufbewahrt. Das Sediment wurde in 2 ml TES gelöst und nach Zugabe von 0,5 ml Ethidiumbromid (10 mg/ml in Aqua dest.) mit TES-Puffer auf ein Volumen von 4 ml gebracht. Zur weiteren Plasmidreinigung wurde dann eine CsCl-Ethidiumbromid Ultrazentrifugation (2.9.3.) durchgeführt.

2.9.3. CsCl-Ethidiumbromid Dichtezentrifugation

3,65g CsCl wurden in 4 ml Plasmidsuspension gelöst, in ein Zentrifugenröhrchen gegeben und durch Überschichten mit Paraffin bis zum Rand aufgefüllt. Die Röhrchen wurden verschlossen und nach dem Austarieren 40 h bei 44 000 Upm und 20° C im Ti 50 Rotor in einer Beckmann Ultrazentrifuge

zentrifugiert. Nach der Zentrifugation waren bei 366 nm 2 Banden sichtbar. Die untere Plasmidbande wurde durch seitliches Anstechen mit einer 1 ml Spritze entnommen und zweimal mit gleichem Volumen Isoamylalkohol extrahiert. Die Plasmid DNA wurde anschließend 24 h in 1000 Volumen TES-Puffer dialysiert und bei -20° C aufbewahrt.

2.9.4. Bestimmung von DNA-Konzentrationen

Die DNA-Konzentration wurde durch die photometrische Messung der Extinktion bei 260nm gegen den Lösungspuffer (TES) als Nullwert bestimmt.
Die DNA Menge wurde nach folgender Formel berechnet:

$$OD_{260} \times 50 = \text{ug DNA / ml}$$

2.9.5. Agarose-Gelelektrophorese

Die Elektrophorese erfolgte in der Flachbettelektrophorese Apparatur Modell H5, der Firma BRL, Rockville, USA. Zur Herstellung eines 0,5%igen Gels wurden 0,5g Agarose in 100ml TAE-Puffer (40 mM Tris, 20 mM Na-acetat, 2 mM EDTA; pH 7,8 mit Essigsäure) im Mikrowellenherd gelöst. Nach Abkühlen unter Rühren wurde das Gel auf den vorher mit Klebeband abgedichteten und mit einem Kamm versehenen Träger der Apparatur gegossen. Nach Erstarren des Gels wurden die Klebebänder entfernt, der Träger in die Elektrophoresevorrichtung eingesetzt und die Kammer mit TAE-Puffer aufgefüllt. Daraufhin wurde der Kamm vorsichtig entfernt und die DNA-Proben in die Geltaschen pipettiert (10 - 20 ul). Die Proben waren vor dem Auftragen mit 1/5 Volumen Probenpuffer (25% Saccharose, 5 mM Na-acetat, 0,1% SDS, 0,05% Bromphenolblau) versetzt worden. Die Elektrophorese erfolgte 4h bei 70V (Spannungsquelle: Power Supply, Modell 500/200, Biorad Laboratories). Nach der Elektrophorese wurde das Agarosegel 15 min mit 2

ug/ml Ethidiumbromid in Aqua dest. gefärbt und unter UV-Licht (Transilluminator Ultra Violet Products Inc. San Gabriel, USA) mit einer Polàroid MP4-Land Kamera durch einen Rotfilter bei Blende 8,0 photographiert. Der Polaroid Positiv Negativ Land Film (Typ 665) wurde 1 bis 2 min belichtet und weiter nach Beschreibung des Herstellers behandelt.

3. ERGEBNISSE

3.1. Protoplastierung

3.1.1. Protoplastierung durch Autolyse (STML)

Eine Methode, mit der alle bisher untersuchten B.t. und B.c. Stämme sehr gut protoplastierbar sind (Protoplastierungsraten: 10^{-3} - 10^{-6}), konnte schon in der vorangegangenen Diplomarbeit (Schall 1984) erarbeitet werden. Bei dieser Methode wird eine Protoplastierung der Zellen durch die Induktion von zelleigenen lytischen Enzymen (Autolysine) erreicht.

Ein wesentlicher Faktor für die Induktion der Autolyse ist die Wachstumsphase, in der die Zellen protoplastiert werden. Das Wachstum von B.thuringiensis ist sehr einfach durch die Messung des pH-Wertes verfolgbar. Dabei ergibt sich eine typische biphasische Kurve. Zuerst wird der vorhandene verwertbare Zucker zu Säuren vergoren, was eine starke Ansäuerung des Mediums bewirkt. Anschließend werden diese Säuren oxidiert, wobei der pH-Wert wieder stark ansteigt. Eine optimale Induktion der Autolyse ist in der Phase des linearen pH-Anstieges nach dem Umschlagen der pH-Kurve möglich ("Autolysephase"). Der pH-Verlauf muß dabei durch die Wahl des Anzuchtmediums optimiert werden (3.1.2.).

Für die Induktion und Wirkung der Autolyseenzyme ist auch die Wahl von geeigneten Protoplastierungsbedingungen ausschlaggebend. Der optimierte Protoplastierungspuffer für die Autolyse (STML) hat folgende Zusammensetzung: 0,5 M Saccharose, 30 mM Tris, 5 mM $MgCl_2$, pH 8,0 mit HCl; 0,5 mg/ml Lysozym.

Die verwendete Saccharosekonzentration (0,5 M) ist für die optimale Induktion der Autolyse und für die Bildung von stabilen Protoplasten notwendig. Sehr wichtig ist der pH des Autolysepuffers (7,8 bis 8,0). Bei pH-Werten unter 7,0 ist nur eine geringe Aktivität der Autolysine feststellbar. Die Zugabe von geringen Mengen an zweiwertigen Kationen ($MgCl_2$) dient der Stabilisierung der Zellmembran. Höhere Konzentrationen an Salzen hemmen die Wirkung der Autolyseenzyme. Dem Autolysepuffer werden 0,5 mg/ml Lysozym zugegeben, da dies die Protoplastierung verbessert und außerdem auch weniger Zellen lysieren.

3.1.2. Optimierung der Anzuchtbedingungen für die Autolyse

3.1.2.1. Anzuchtmedium

Die Anzucht der Zellen für die Autolyse wurde zuerst in HGP durchgeführt. Der hohe Glucosegehalt (0,5%) dieses Mediums ergibt jedoch eine U-förmige pH-Kurve mit sehr niedrigen pH-Werten. Durch Reduktion des Glucosegehalts (0,1%) konnte schon in der Diplomarbeit eine Verbesserung des pH-Verlaufes erreicht werden. Doch auch mit diesem Medium war die Autolyse oft nicht reproduzierbar. Es zeigte sich, daß verschiedene Komplexmedienbestandteile zu sehr unterschiedlichen pH-Kurven führen. Daher wurde der Einfluß von verschiedenen Hefeextrakten und Peptonen auf den pH-Verlauf untersucht. Die besten Ergebnisse ergaben Difco Hefeextrakt und Oxoid Peptonized Milk (AP-Medium). Dieses Medium wurde in weiteren Versuchen zur Anzucht der Zellen für die Autolyse verwendet.

3.1.2.2. Belüftung

Der Einfluß der Belüftung auf den pH-Verlauf ist in Abb.2 dargestellt. Die Vergärung von Glucose ist für die starke Ansäuerung des Mediums verantwortlich, deshalb ist diese Wachstumsphase nicht sauerstoffabhängig. Im Gegensatz dazu wird der anschließende pH-Anstieg durch die Veratmung der gebildeten Säuren hervorgerufen. Eine gute Belüftung führt daher zu einem wesentlich schnelleren Anstieg des pH-Wertes. Zur Protoplastierung durch Autolyse wurden die Zellen immer in 100 ml AP-Medium angezogen.

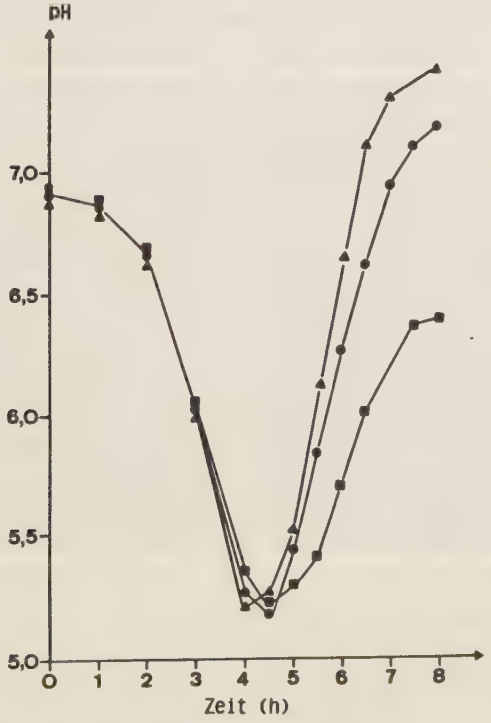

Abb.2: pH-Verlauf bei Anzucht von B.t.israelensis Stamm 60A in Erlenmeyerkolben (500 ml; 1 seitlicher Einstich) mit verschiedenen Füllmengen an AP-Medium.
▲ 100 ml; ● 200 ml; ■ 300 ml.

3.1.3. Unterscheidung von Enzymwirkung, Autolyse und osmotischem Schock

Bakterien werden normalerweise durch die Wirkung von Murein-Hydrolasen protoplastiert. Die Versuche zur Autolyse von B.thuringiensis haben jedoch gezeigt, daß es mindestens 3 Möglichkeiten zur Lyse von B.t.-Zellen gibt. So kann eine Protoplastierung/Lyse der Zellen durch die Wirkung von zugegebenen Enzymen oder durch zelleigene Enzyme erreicht werden. Außerdem können Zellen auch durch osmotischen Schock lysieren. Für weitere Protoplastierungsversuche (siehe 3.1.4.) war es notwendig, Bedingungen zu finden, bei denen nur die zugegebenen Enzyme wirksam sind.
Aufgrund der Erfahrungen der Autolyseversuche wurde eine Wachstumsphase gesucht, bei der eine Lyse von Zellen durch Autolyse und osmotischen Schock nicht möglich ist. Eine unter Sauerstofflimitierung (langsames Schütteln) angezogene Übernachtkultur (16 h in 20 ml HGP) ist dazu sehr gut geeignet. Abb.3a,b zeigt den Unterschied einer HGP-Übernachtkultur und einer AP-Kultur in der Autolysephase. Die Kultur in der Autolysesephase ist charakterisiert durch den Übergang von langen unbeweglichen Zellen in kurze bewegliche Stäbchen. In dieser Phase sind die Zellen sehr empfindlich, da Zwischenwände noch nicht vollständig gebildet sind. Die kurzen Stäbchen der Übernachtkultur sind dagegen sehr lyseresistent.

Die verschiedenen Lyseaktivitäten können auch durch die Wahl der Protoplastierungsbedingungen selektiv untersucht werden: Im Autolysepuffer (STM) sind Autolyseenzyme und osmotischer Schock wirksam. Durch Erniedrigung des pH-Wertes (pH 6,5 -> SMM) kann die Autolysewirkung ausgeschaltet werden. Im Vergleich mit einem Kontrollpuffer (ohne Saccharose -> MM) kann so der Einfluß der hohen Saccharosekonzentration gemessen werden. Im Gegensatz zur Kultur in der Autolysephase wurde bei der Übernachtkultur mit diesen Puffern keine Lyse der Zellen erreicht (Tab.1).

Abb. 1: Phasenkontrastmikroskopische Aufnahmen von B.cereus
nach 1,5 Std. (a, c) bzw. 3 Std. (b, d) Inkubation
in Lysozym-Lösung (a, b) bzw. Lysozym-Lösung
mit Zusatz von 0,5 % Natriumdodecylsulfat (c, d).
Die Pfeile weisen auf Protoplasten hin.
a, b: Inkubation in MSP-Medium
c, d: Inkubation in PP-Puffer
a: Aufnahmeeinstellung nach 2 h Inkubation in MSP
b: Aufnahmeeinstellung nach 2 h Inkubation in PP

Tab.1: Lyse von Zellen einer HGP-Übernachtkultur und einer AP-Kultur in der Autolysephase von B.c. UM7-1 nach 2 h Inkubation in verschiedenen Puffern. Es wurden die Lebendzellzahlen vor und nach der Inkubation durch Verdünnen in SSC und Plattieren auf HGP-Medium bestimmt. Angegeben ist das Verhältnis der Zellzahlen nach 2 und 0 h Inkubation.

Puffer	Lebendzellzahl in % der Ausgangszellzahl	
	Übernachkultur	Autolysekultur
MM	>95	83
SMM	>95	17
STM	>95	1

Osmotischer Schock und Autolyse sind nicht nur durch unterschiedliche Lyseraten unterscheidbar. Die hohe Saccharosekonzentration (SMM) führt zur Lyse von Zellen, aber nicht zum Abbau der Zellwand (Abb.3c). Durch die Induktion von Autolyseenzymen wird dagegen in STM auch die Zellwand abgebaut (Abb.3d).

3.1.4. Protoplastierung ohne Autolysewirkung

Mit der in 3.1.1. beschriebenen Methode wird zwar eine gute Protoplastierung von B.thuringiensis Stämmen erreicht, in Versuchen zur Regeneration dieser Protoplasten wurden jedoch nur sehr geringe Regenerationsraten erzielt. Da die Induktion von Autolyseenzymen die Grundlage dieser Methode ist, lag der Verdacht nahe, daß die Wirkung dieser Enzyme für die schlechte Regeneration verantwortlich ist. Deshalb wurde nach Möglichkeiten gesucht, eine Protoplastierung ohne Autolysewirkung zu erreichen. Es wurden verschiedene Murein-Hydrolasen getestet (Chalaropsis-Enzym: Hash 1963; Lysostaphin: Schindler und Schuchardt 1964); Mutanolysin: Siegel et al. 1981; Lysozym), doch nur mit Lysozym und Mutanolysin

konnte eine Protoplastierung beobachtet werden. Die Ergebnisse dieser Versuche sind in 3.1.4.1. und 3.1.4.2. zusammengefaßt. Um eine Autolysewirkung auszuschließen, wurden immer Übernachtkulturen zur Protoplastierung verwendet. Die Protoplastierung durch Autolyse erfordert eine genaue Bestimmung der optimalen Wachstumsphase. Die Verwendung von Übernachtkulturen erleichtert daher auch die Anzucht der Zellen für die Protoplastierung.

3.1.5.1. Lysozym (MML)

Die Versuche zur Protoplastierung von B.t. mit Lysozym ergaben einige überraschende Ergebnisse. Eine Protoplastierung von Zellen einer Übernachtkultur war auch in einem osmotisch nicht stabilisierten Puffer (MM: 20 mM Maleinsäure, 20 mM $MgCl_2$ pH 6,5) möglich. Wichtig ist nun, daß die Protoplastierung in MM wesentlich besser war, als in SMM (Abb.4a,b). Für die Bildung von stabilen Protoplasten in einem Puffer ohne osmotische Stabilisierung ist das Vorhandensein von zweiwertigen Kationen (Mg oder Ca) ausschlaggebend. In einem Puffer ohne diese Ionen (oder mit Na) erfolgte zwar ein Abbau der Zellwand, es wurden aber keine Protoplasten gebildet (Abb.4c). Für eine Protoplastierung sind hohe Lysozymkonzentrationen notwendig. Die Protoplastierung von B.t. mit Lysozym wurde deshalb in MM-Puffer mit 5 mg/ml Lysozym (MML) durchgeführt.

3.1.5.2. Mutanolysin und Lysozym (SMMP M/L)

Mutanolysin, eine Muramidase aus Streptomyces globisporus 1829, wurde in einem Screening auf lytische Enzyme gegen Streptococcus mutans gefunden (Yokogawa et al. 1975). In ersten Versuchen mit Übernachtkulturen von B.t.thuringiensis HD-2 D6-4 konnte mit diesem Enzym eine deutliche Protoplastierung in SMM erreicht werden. Eine Kombination von Mutano-

lysin (1000 U/ml) und Lysozym (1 mg/ml) ergab eine weitere Verbesserung der Protoplastierung (>95 % Protoplasten). Für die Transformation ist die Inkubation der Protoplasten in einem osmotisch stabilisierten Komplexmedium (SMMP) notwendig (3.3.1.). Um Streßsituationen durch Medienwechsel auszuschließen, wurden die Zellen direkt in SMMP M/L (1000 U Mutanolysin/ml; 1 mg/ml Lysozym) protoplastiert.

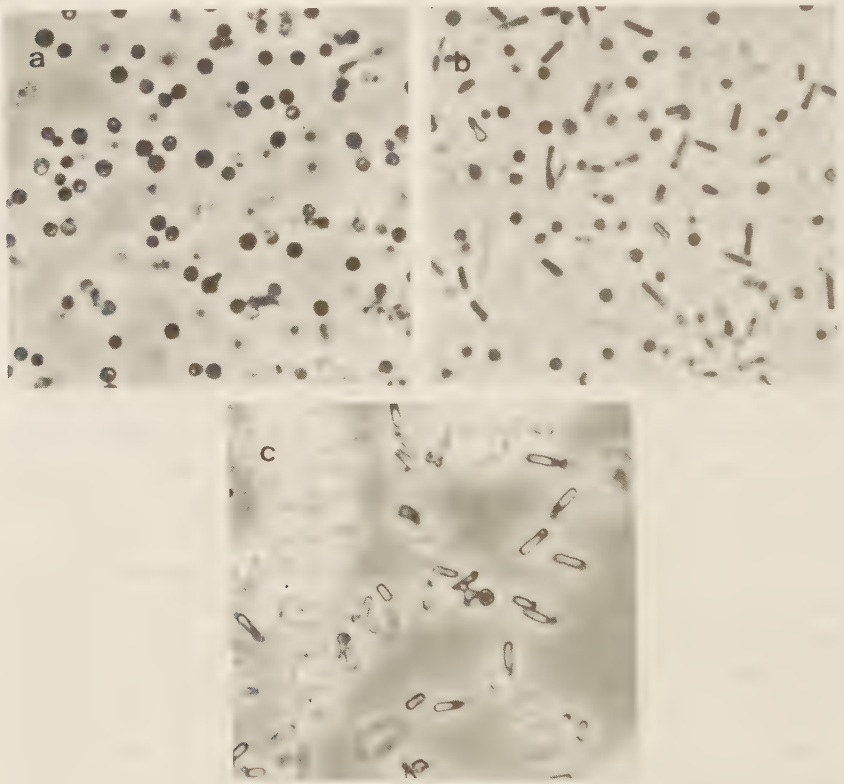

Abb.4: Protoplastierung einer Übernachtkultur von B.cereus UM7-1 nach 2 h Inkubation in verschiedenen Puffern mit 5 mg/ml Lysozym.
a. MM: 20mM Maleinsäure; 20 mM $MgCl_2$ pH 6,5
b. SMM: MM mit 0,5M Saccharose
c. M: 20 mM Maleinsäure pH 6,5

3.1.5. Protoplastierbarkeit von verschiedenen Stämmen

Die Protoplastierbarkeit von verschiedenen Stämmen mit den drei gefundenen Protoplastierungsmethoden wurde untersucht. Dazu wurden die Zellen aus je 5 ml Autolysekultur in 1 ml STML-Puffer, bzw. je 5 ml Übernachtkultur in jeweils 1 ml MML oder SMMP M/L-Puffer überführt.Nach 3 h Inkubation bei 27° C wurde die Protoplastierung im Phasenkontrastmikroskop überprüft.

Tabelle 2 zeigt, daß alle Stämme durch Autolyse (STML) protoplastierbar sind. Die Protoplastierung mit Lysozym (MML) und Mutanolysin/Lysozym (SMMP M/L) ist jedoch stammspezifisch sehr unterschiedlich.

Tab.2: Protoplastierung von verschiedenen Stämmen mit SMMP M/L, MML und STML. Für die Angabe der Protoplastierung wurde folgende Werteskala verwendet:
\- < 25 % Protoplasten -/+ 25-50 % Protoplasten
\+ 50-75 % Protoplasten ++ > 75 % Protoplasten
A Aggregation

Stamm	Serotyp	Pathotyp	Protoplastierung SMMP M/L	MML	STML
BI 256-82	8	C	+A	++A	++
60A	14	B	-	-	++
PG-14	8	B	-/+	+A	++
VIII/84	8	A	+	++	++
VII/73	7	A	-	-	++
HD-8 pC194	5	A	-	++A	++
HD-73 30	3	A	+	++	++
HD-1	3	A	-/+	++	++
HD-2 D6	1	A	++	+	++
B.c. DSM 31	-	-	-	++	++
B.c. DSM 351	-	-	-/+	-A	++
B.c. NRRL 569	-	-	-/+	++	++

3.2. Regeneration

3.2.1. Regenerationsmedium

Das in dieser Arbeit verwendete Regenerationsmedium (R) ist in 2.2.4. dargestellt. Die wichtigsten Bestandteile dieses Mediums sind hohe Konzentrationen an Gelatine, Stärke und Agar. Ohne Gelatine oder Stärke war keine Regeneration nachweisbar (Schall 1984). Mit diesem Medium wurden nur geringe Regenerationsraten erzielt, so daß eine Regeneration nur bei hohen Protoplastierungsraten (Protoplastierung durch Autolyse) erkennbar war.

Eine wichtige Möglichkeit zur Verbesserung der Regeneration konnte bei der Optimierung der Antibiotikakonzentrationen in Regenerationsplatten zur direkten Selektion von Transformanten gefunden werden. In diesem Versuch wurden die Stämme HD-2 D6-4 und HD-2 pC194 (das Plasmid pC194 codiert für Chloramphenicolresistenz) durch Autolyse protoplastiert und nach Waschen und Verdünnen mit SMMP auf HGP-Platten und Regenerationsplatten mit verschiedenen Konzentrationen an Chloramphenicol ausgesät. In Tabelle 3 sind die Ergebnisse dieses Versuches dargestellt. Die wesentliche Schlußfolgerung dieses Versuches ist, daß durch die Zugabe von sublethalen Konzentrationen an Chloramphenicol zum Regenerationsmedium eine deutliche Steigerung der Regeneration erzielt wird. Die Zugabe von Chloramphenicol kann die hohen Konzentrationen an Gelatine und Stärke im Regenerationsmedium nicht ersetzen. Ohne Gelatine oder Stärke wurde auch mit Chloramphenicol keine meßbare Regeneration erreicht.

Ohne Chloramphenicol waren vegetative Kolonien nach 1-2 Tagen, regenerierte Kolonien nach 3-4 Tagen sichtbar. Die Zugabe von Chloramphenicol bewirkte ein deutlich langsameres Wachstum der nicht-protoplastierten Zellen, so daß beide Kolonietypen erst nach 4-7 Tagen erkennbar waren.

Tab.3: Einfluß der Chloramphenicolkonzentration in Regenerationsplatten auf die Regeneration von HD-2 pC194 und HD-2 D6-4. Die Zellen wurden durch Autolyse protoplastiert.

Medium	Chloramphenicolkonzentration (ug/ml)	Lebendzellzahl/ml HD-2 pC194	HD-2 D6-4
HGP	0	$1,2 \times 10^5$	$1,0 \times 10^4$
R	0	$2,4 \times 10^5$	$1,1 \times 10^5$
	1	$3,5 \times 10^5$	$3,5 \times 10^7$
	10	$8,0 \times 10^6$	0
	25	$1,5 \times 10^5$	0

3.2.2. Unterschiedliche Protoplastierungsmethoden

Die Probleme der direkten Messung der Regeneration sind sehr gut durch den Vergleich der Regeneration nach dem Zellwandabbau mit verschiedenen Protoplastierungsmethoden darstellbar (Tab.4). In SMMP M/L wurde im Vergleich mit der Protoplastierung durch Autolyse (>99,99%) nur eine geringe Protoplastenbildung (91,4%) erreicht. Mit SMMP M/L war eine Regeneration daher nur mit einem optimierten Medium (RCl) meßbar. Die Regenerationsraten waren jedoch bei beiden Protoplastierungsmethoden sehr ähnlich. Eine Protoplastierung ohne Autolyseenzyme (SMMP M/L) ergab keine deutliche Verbesserung der meßbaren Regeneration.

Tab.4: Regeneration von HD-2 D6-4 nach Protoplastierung in STML und SMMP M/L.
RCl: R mit 1 ug/ml Chloramphenicol.

		STML	SMMP M/L
Gesamtzellzahl/ml (Zählkammer)		$1,1 \times 10^9$	$1,4 \times 10^9$
Lebendzellzahl/ml	HGP	$2,3 \times 10^4$	$1,2 \times 10^8$
	R	$2,1 \times 10^5$	$1,0 \times 10^8$
	RCl	$5,5 \times 10^7$	$2,1 \times 10^8$
Protoplastierungsrate		$2,1 \times 10^{-5}$	$8,6 \times 10^{-2}$
Regenerationsrate (%)	R	0,02	-
	RCl	5	6,4

3.2.3. Regeneration von verschiedenen Stämmen

In Tabelle 5 sind die Ergebnisse von Regenerationsversuchen mit unterschiedlichen B.t. und B.c. Stämmen dargestellt. Es wurde jeweils die Regeneration auf R-Medium mit 1 und 2 ug/ml Chloramphenicol (RCl bzw. RC2) verglichen. Die Regenerationsraten waren in den meisten Stämmen sehr gering (0,01 bis 0,1 %), nur mit wenigen Stämmen wurden Raten über 1% erreicht. Die beste Regeneration wurde wie erwartet mit HD-2 D6-4 erzielt (7%), mit diesem Stamm war die Optimierung des Regenerationsmediums durchgeführt worden. Die Versuche zeigen, daß auch in anderen Stämmen durch die Zugabe von geringen Chloramphenicolkonzentrationen eine Verbesserung der Regeneration erreicht werden kann. Die optimale Chloramphenicolkonzentration ist je nach Stamm unterschiedlich.

Tab.5: Regeneration von verschiedenen Stämmen nach Protoplastierung durch Autolyse.

Stamm	Protoplastierungsrate	Regenerationsrate (%) RC1	RC2
BI 256-82	$5,7x10^{-5}$	0,029	0,095
60A	$1,5x10^{-4}$	0,02	0,01
PG-14	$2,7x10^{-4}$	1,1	0,37
VIII/84	$1,0x10^{-6}$	0,011	0,37
HD-73 30	$2,0x10^{-4}$	0,006	0,035
HD-2 D6-4	$1,9x10^{-5}$	7	-
B.c.UM10	$8,6x10^{-5}$	0,041	0,13
B.c.DSM 351	$1,7x10^{-4}$	0,43	4,2

3.3. Transformation

Ein für Bacillus subtilis sehr effizientes Protoplastentransformationssystem ist von Chang und Cohen (1979) beschrieben worden. Diese Methode war die Grundlage der folgenden Transformationsversuche, wobei die Protoplastierung und Regeneration, wie für B.thuringiensis notwendig (3.1. und 3.2.), abgeändert wurde. Zur Messung der DNA-Aufnahme wurden die Plasmide pBC16 und pC194 verwendet. Das Plasmid pBC16 codiert für Tetracyclinresistenz und stammt aus B.cereus (Bernhard et al. 1978). Das Plasmid pC194 trägt ein Chloramphenicol-Acetyl-Transferase Gen und ist ursprünglich aus Staphylococcus aureus isoliert worden (Ehrlich 1977).

3.3.1. Direkte Selektion von Transformanten

Eine direkte Selektion von transformierten Protoplasten wird durch die Zugabe des jeweiligen Antibiotikums zum Regenerationsmedium erreicht. Die Antibiotikakonzentration muß dabei

so gewählt werden, daß nur transformierte Zellen auf den Regenerationsplatten wachsen können. Bei einer zu hohen Konzentration können transformierte Protoplasten mit einer geringen Expression der Resistenz aber auch nicht wachsen. Erste Vorversuche mit B.t.thuringiensis HD-2D6-4 ergaben optimale Antibiotikakonzentrationen für Chloramphenicol und Tetracyclin zwischen 10 und 15 ug/ml.
Ein weiterer wichtiger Faktor ist die Expression der Resistenz. Für die Ausprägung der Resistenz ist nach der Aufnahme der Plasmid DNA durch die Zelle auch die Bildung des eigentlichen Resistenzproteins (z.B. Chloramphenicol-Acetyl-Transferase) notwendig, d.h. es muß eine Transkription und Translation stattfinden. In der Arbeit von Chang und Cohen (1979) wird dies durch die Inkubation der transformierten Protoplasten in einem osmotisch stabilisierten Komplexmedium (SMMP) erreicht.

3.3.2. Isolierung von DNA für Transformationsversuche

Es waren nur B.t.-Stämme mit den Plasmiden pC194 und pBC16 verfügbar. Da die Isolierung von Plasmiden aus B.t. schwierig ist, wurden die Resistenzplasmide in B.subtilis DSM 402 übertragen. Dazu wurden die Stämme HD-2 pC194 und HD-2 D6 (pBC16), wie in 2.9.2. beschrieben, mit DSM 402 fusioniert und anschließend zur Regeneration auf DM-3 Medium ausgesät. Auf diesem Medium regeneriert nur B.subtilis, so daß bei einer hohen Protoplastierungsrate nur DSM 402 Kolonien wachsen können. Die Regenerationsplatten wurden nach 4 Tagen Inkubation bei 37°C auf HGP-Medium mit 10 ug/ml Chloramphenicol bzw. Tetracyclin überstempelt und weitere 24 h inkubiert. Ungefähr 0,1% der Kolonien auf DM-3 Medium waren antibiotikaresistent. Plasmid DNA für die Transformationsversuche wurde dann aus resistenten Kolonien (DSM 402 F45-1: pC194; DSM 402 F5a: pBC16) nach der in 2.9.1. dargestellten Methode isoliert.

3.3.3. Erste Versuche zur direkten Selektion

Zur Transformation von Bacillus subtilis werden die Protoplasten (in SMMP) 2 min mit Plasmid DNA in Gegenwart von 30% PEG 6000 (in SMM) inkubiert und nach dem abzentrifugieren zur Expression der Resistenz 90 min in SMMP bei 37° C inkubiert. Anschließend werden die Protoplasten zur Regeneration und Selektion auf Regenerationsplatten mit entsprechenden Mengen an Antibiotikum ausgesät. In ersten Transformationsversuchen mit diesen Bedingungen (die Inkubationstemperatur wurde auf 27° C gesenkt) konnte keine Transformation von B.thuringiensis nachgewiesen werden. Um methodische Fehler auszuschließen, wurde die Transformation von B.subtilis DSM 402 mit 1 ug pBC16 DNA untersucht. In diesem Versuch konnte eine Transformationsrate von 10^7 Transformanten/ug DNA (10% der Kolonien auf DM-3 Medium) erzielt werden.
Weitere Versuche zeigten dann, daß nicht die eigentliche Transformation, sondern die Expression der Resistenz das Problem war. So konnte durch die Verlängerung der Inkubationszeit in SMMP eine Transformation erreicht werden. In Tab.6 sind die Ergebnisse von Protoplastentransformationsversuchen mit HD-2 D6-4 nach 5 h Inkubation in SMMP dargestellt. Die Versuche zeigen, daß eine eindeutige Selektion von transformierten Zellen, mit optimalen Konzentrationen an Tetracyclin (15 ug/ml) und Chloramphenicol (10 ug/ml), möglich ist.

Tab.6: Transformation von HD-2 D6-4 mit pBC16 und pC194 nach Protoplastierung in SMMP M/L.

Plasmid	Zellzahl/ml auf R-Platten mit folgenden Konzentrationen an Antibiotika (ug/ml):			
	Tetracyclin		Chloramphenicol	
	10	15	10	15
pBC16	$2x10^4$	$7x10^4$	0	0
pC194	>30	0	$1x10^5$	$3x10^2$

3.3.4. Chloramphenicoleffekt

Die Zugabe von geringen Chloramphenicolkonzentrationen zu den Regenerationsplatten ergab eine deutliche Verbesserung der Regeneration (3.2.1.). Es wurde deshalb untersucht, wie sich die Chloramphenicolzugabe auf die Transformation auswirkt. Dazu wurden Protoplasten von HD-2 D6-4 nach Transformation mit pBC16 und 5 h Inkubation in SMMP auf R-Platten mit 15 ug/ml Tetracyclin und unterschiedlichen Konzentrationen an Chloramphenicol ausgesät. Wie in Tabelle 7 gezeigt, führt die Zugabe von Chloramphenicol auch zu einer Verbesserung der Transformation, mit einem Optimum bei 1 ug/ml Chloramphenicol.

Tab.7: Stimulierung der Transformation von HD-2 D6-4 mit pBC16 durch Stimulierung der Regeneration mit Chloramphenicol. Die Zellen wurden 2 h in SMMP M/L protoplastiert.

Chloramphenicolkonzentration in Regenerationsplatten (ug/ml)	Tc-resistente Transformanten/ml
0	$8,7 \times 10^4$
0,5	$1,7 \times 10^5$
0,75	$3,8 \times 10^5$
1	$7,0 \times 10^5$
2,5	$4,0 \times 10^1$
5	0

3.3.5. Protoplastierungsmethode

In den bisherigen Versuchen wurden die Zellen immer mit Mutanolysin und Lysozym (SMMP M/L) protoplastiert. In 3.1. sind 3 unterschiedliche Methoden zur Protoplastierung von B.thuringiensis gezeigt worden, mit denen auch unterschiedliche Protoplastierungsraten erreicht wurden. Der Einfluß

der Protoplastierungsmethode auf die Transformation ist in der Tabelle 8 dargestellt. Es ist ersichtlich, daß nicht die Protoplastierungsrate, sondern die Protoplastierungsmethode für die Transformationsrate entscheidend ist. Die schonendste Methode ist die Protoplastierung mit SMMP M/L, bei der auch mit sehr geringen Protoplastierungsraten noch wesentlich höhere Transformationsraten (ungefähr Faktor 10) erreicht wurden, als nach der Protoplastierung durch Autolyse (STML).

Tab.8: Effekt der Protoplastierungsmethode auf die Protoplastentransformation von HD-2 D6-4 und B.c.UM7-1 mit 3 ug pBC16 DNA.

Stamm	Protoplastierung in:					
	MML		SMMP M/L		STML	
	P%	T/ml	P%	T/ml	P%	T/ml
B.c.UM7-1	98	$4x10^4$	50	$3x10^5$	>99,9	$4x10^4$
HD-2 D6-4	-	-	93	$5x10^5$	>99,99	$3x10^4$

P% Protoplastierung in %
T/ml Transformanten/ml (Tc-resistente Kolonien/ml)

3.3.6. Kontrollversuche

Zum Nachweis der Protoplastentransformation wurden einige Kontrollversuche durchgeführt (Tab.9). Eine Transformation war nur mit protoplastierten Zellen möglich. Ohne DNA-Zugabe oder bei Transformation von vegetativen Zellen konnten keine tetracyclinresistenten Kolonien erhalten werden.Der Nachweis von Plasmid DNA in transformierten Zellen ist in 3.3.9. gezeigt.

Tab.9: Transformationsversuche von HD-2 D6-4 mit pBC16 DNA zur Bestätigung der Protoplastentransformation. Die Protoplastierung wurde im Phasenkontrast-Mikroskop abgeschätzt.
RTC1: R-Medium mit 15 ug/ml Tetracyclin und 1 ug/ml Chloramphenicol.

Versuch	I	II	III
Vorbehandlung der Zellen	SMMP M/L	SMMP M/L	SMMP
DNA Konzentration	3 ug	ohne DNA	3 ug
Protoplastierung %	> 90	> 90	0
Lebendzellzahlen/ml			
HGP	$1{,}1 \times 10^8$	$1{,}0 \times 10^8$	$9{,}1 \times 10^8$
RC1	$1{,}6 \times 10^8$	$1{,}3 \times 10^8$	$7{,}5 \times 10^8$
RTC1	$1{,}5 \times 10^6$	0	0
RTC1 ohne Saccharose	0	0	0

3.3.7. Optimierung der Protoplastentransformation

In den nachfolgenden Versuchen wurde der Einfluß von verschiedenen Parametern auf die Transformation untersucht, um die Transformationsbedingungen zu optimieren. Wenn nicht anders angegeben, wurde der Stamm HD-2 D6-4 mit SMMP M/L protoplastiert und mit 10 ul pBC16 DNA (ca. 3ug) in 30% PEG 6000 transformiert. Die Selektion erfolgte nach 5 h Inkubation in SMMP bei 27° C auf RTC1-Platten.

3.3.7.1 Zelldichte

Die vorherigen Versuche haben gezeigt, daß eine lange Inkubationszeit in SMMP für eine Expression der Tetracyclinresistenz notwendig ist. SMMP ist aber ein osmotisch stabilisiertes Komplexmedium, in dem auch nicht-protoplastierte

vegetative Zellen wachsen könnten. Im folgenden Versuch wurde die Vermehrung von vegetativen Zellen während der Inkubation zur Expression der Resistenz untersucht.
Dazu wurden die Protoplasten nach der Transformation in verschiedenen Zelldichten (Verdünnungen) in SMMP inkubiert. Nach 0 und 5 h wurde die Zellsuspension zur Bestimmung der Zellzahl von nicht-protoplastierten Zellen nach Verdünnen auf HGP-Platten ausgesät. Die Anzahl an transformierten Zellen wurde nach 5 h Inkubation durch Plattieren auf RTCl-Platten bestimmt.

Tab.10: Einfluß der Zelldichte auf die Vermehrung von vegetativen Zellen während der Inkubation in SMMP.

Verdünnung	1	1/10	1/40
Gesamtzellzahl (Zählkammer)	$2x10^9$	$2x10^8$	$5x10^7$
Zellzahl vegetative Zellen			
t = 0 h	$5,7x10^7$	$5,7x10^6$	$1,4x10^6$
5 h	$8,6x10^7$	$4,6x10^7$	$5,8x10^7$
Vermehrung	1,5	8,1	41,4
Transformanten/ml	$1,7x10^5$	$7,4x10^3$	$3,5x10^3$
Transformationsrate			
bezogen auf Ausgangstiter	$3,0x10^{-3}$	$1,3x10^{-3}$	$2,5x10^{-3}$
bezogen auf Endtiter	$2,0x10^{-3}$	$1,6x10^{-4}$	$6,0x10^{-5}$

Geringe Zellkonzentrationen führten zu einer starken Vermehrung von vegetativen Zellen, was eine Erniedrigung der Transformationsrate (Transformanten/sichtbare Kolonie) bewirkte (Tab.10). Bei hohen Zelldichten war dagegen eine deutliche Wachstumshemmung von nicht-protoplastierten Zellen sichtbar. In weiteren Versuchen wurden Zelldichten $>10^9$/ml verwendet.

3.3.7.2. Inkubationszeit mit PEG

Bei der Protoplastentransformation wird eine Aufnahme von DNA durch die Inkubation von Protoplasten in hohen PEG-Konzentrationen erreicht. Es wurde daher untersucht, ob die Zeit der Inkubation von Protoplasten mit DNA und PEG für die Transformation wichtig ist. Wie in Tabelle 11 dargestellt, ergaben Inkubationzeiten zwischen 1 und 20 min keine großen Unterschiede in der Transformationsrate. Dies bedeutet, daß mehrere Transformationsversuche parallel durchgeführt werden können.

Tab.11: Effekt der Inkubationszeit der Protoplasten mit PEG und DNA auf die Protoplastentransformation.

Inkubationszeit (min)	Transformanten/ml
1	$3,6 \times 10^5$
5	$4,9 \times 10^5$
10	$2,5 \times 10^5$
20	$2,9 \times 10^5$

3.3.7.3. PEG-Konzentration

Polyethylenglykoll ist das die Transformation induzierende Agens der Methode, wobei die Konzentration an PEG ausschlaggebend ist. Ohne PEG wurde nur eine sehr geringe Aufnahme von Plasmid DNA erreicht. Mit steigender Konzentration verbesserte sich die Transformationsrate mit einem Optimum bei 30% PEG (Abb.5). Noch höhere PEG-Konzentrationen führten zu einer deutlichen Verschlechterung der Transformation. Dies ist durch die bei diesen Konzentrationen auftretende Fusion von Protoplasten erklärbar.

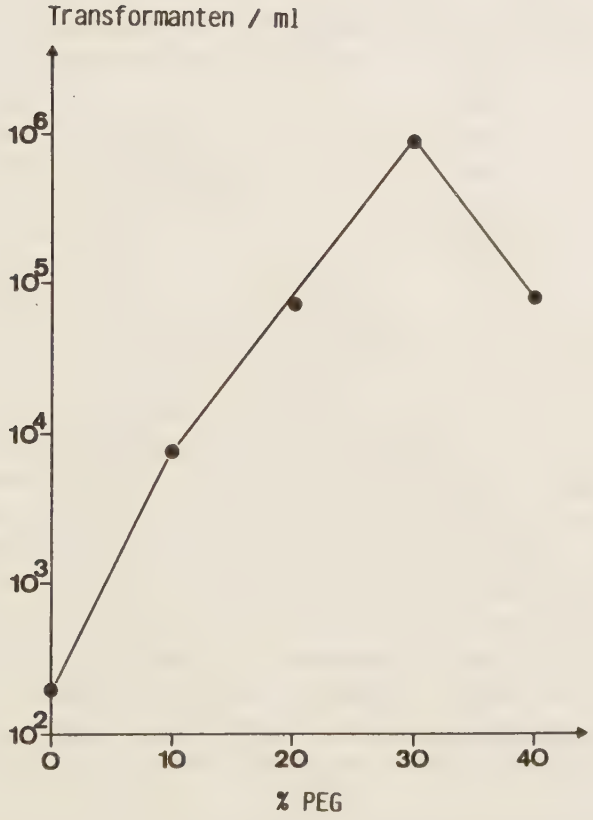

Abb.5: Abhängigkeit der Transformationsrate von der PEG-Konzentration.

3.3.7.4. Molekulargewicht PEG

Auch das Molekulargewicht des verwendeten Polyethylenglykolls hat einen Einfluß auf die Transformationsrate. Wie in Tab.12 gezeigt, wurde die beste Transformation bei einem Molekulargewicht von 6000 erzielt.

Tab.12: Einfluß des Molekulargewichts des verwendeten Polyethylenglykols auf die Transformationsrate.

Molekulargewicht PEG	Transformanten/ml
1 000	$3,5 \times 10^4$
1 550	$2,8 \times 10^5$
4 000	$2,4 \times 10^6$
6 000	$3,3 \times 10^6$
20 000	$5,2 \times 10^5$

3.3.7.5 Induktion der Antibiotikaresistenz

Beim Vergleich der Transformationsraten nach direkter oder indirekter Selektion wurden durch indirekte Selektion wesentlich höhere Raten erzielt (Tab.13). In Vorversuchen zur optimalen Antibiotikakonzentration in Regenerationsplatten war die Antibiotikaresistenz stark davon abhängig, ob die Zellen unter selektiven (mit Antibiotikum) oder nicht-selektiven (ohne Antibiotikum) Bedingungen angezogen wurden. Dies war nur durch die in Gegenwart des Antibiotikums höhere Expression erklärbar. Deshalb wurde untersucht, ob die Tetracyclinresistenz durch die Zugabe von geringen Antibiotikakonzentrationen induziert werden kann.

Tab.13: Vergleich von direkter und indirekter Selektion nach der Transformation von HD-2 D6-4 mit pBC16. Die indirekte Selektion wurde durch Regeneration auf RC1 und anschließendes Überstempeln auf HGP mit 15ug/ml Tetracyclin durchgeführt.

Proto-plastierung	Transformanten/ml direkte Selektion	indirekte Selektion
SMMP M/L	$5,4 \times 10^5$	$4,4 \times 10^6$
STML	$2,4 \times 10^4$	$2,8 \times 10^5$

Die Zugabe von 1 ug/ml Tetracyclin während der Inkubation in SMMP führte zu einer höheren Transformationsrate. Außerdem war die Inkubationszeit zur Expression der Resistenz wesentlich kürzer (Abb.6). Durch Zugabe von 1 ug/ml Tetracyclin wurde schon nach 90 min Inkubation ein Optimum an Transformanten erreicht.

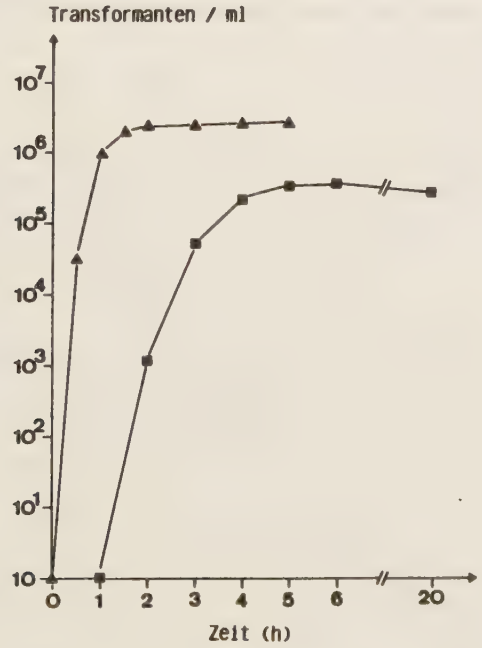

Abb.6: Inkubationszeit zur Expression der Antibiotikaresistenz. 10^9 Protoplasten von HD-2 D6-4 wurden mit 1 ug pBC16 transformiert und anschließend in SMMP bzw. SMMP mit lug/ml Tetracyclin inkubiert. Nach verschiedenen Zeiten wurden Proben entnommen und nach Verdünnen in SMMP auf RTC1-Medium plattiert.

■ Inkubation in SMMP

▲ Inkubation in SMMP mit 1 ug/ml Tetracyclin

3.3.7.6. Plasmidkonzentration

Nach in vitro Manipulation von DNA hat man oft nur geringe DNA-Konzentrationen für die Transformation zur Verfügung. Es ist deshalb wichtig, daß das Transformationssystem eine große Empfindlichkeit besitzt. Abb.7 zeigt die Abhängigkeit der Transformationsrate von der Plasmid DNA-Konzentration. Mit 1 ng DNA konnten noch mehr als 1000 Transformanten erhalten werden.

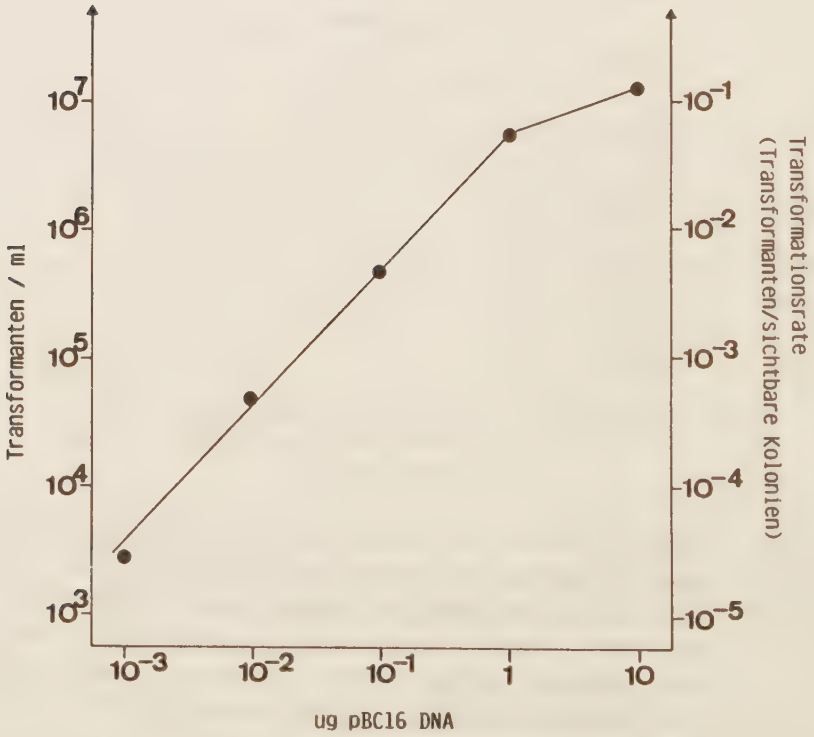

Abb.7: Effekt der Plasmid DNA Konzentration auf die Transformation von HD-2 D6-4 mit pBC16.

3.3.8. Transformation von verschiedenen Stämmen

Die Optimierung der Transformation erfolgte mit HD-2 D6-4. Gesucht war aber ein System, mit dem möglichst alle Stämme transformierbar sind. Die Transformierbarkeit von verschiedenen Stämmen mit den vorher optimierten Bedingungen wurde daher untersucht. Um ein möglichst breites Spektrum an Stämmen zu untersuchen, wurden Isolate aus allen Pathotypen und auch einige B.cereus Stämme verwendet. Die Zellen wurden durch Autolyse protoplastiert, da dies die einzige Methode ist, mit der alle Stämme protoplastierbar sind. Die Ergebnisse von Transformationen mit dem Plasmid pBC16 sind in der Tabelle 14 dargestellt. Von allen untersuchten Stämmen konnten transformierte Kolonien gefunden werden, die Transformationsraten waren aber sehr unterschiedlich.

Tab.14: Transformation von verschiedenen Stämmen von B.t und B.c. mit 1 ug pBC16 DNA.Zur Expression der Resistenz wurden die Protoplasten nach der Transformation 90 min in SMMP mit lug/ml Tetracyclin inkubiert.

Stamm	Patho-typ	Transformanten / ml direkte Selektion	indirekte Selektion
BI 256-82	C	2×10^5	7×10^4
60A	B	2×10^2	1×10^3
PG-14	B	4×10^3	1×10^3
VIII/84	A	1×10^5	6×10^4
HD-73 30	A	2×10^4	3×10^4
HD-2 D6-4	-	1×10^5	2×10^5
B.c.DSM 351	-	3×10^5	2×10^5
B.c.UM10	-	4×10^3	4×10^4

3.3.9. Nachweis von Plasmid DNA in transformierten Stämmen durch Agarose-Gelelektrophorese.

Zum Nachweis der Resistenzplasmide in transformierten Zellen wurde die Plasmid DNA nach der in 2.9.2. beschriebenen Methode isoliert. Abb.8 zeigt die Plasmidmuster von mit pBC16 und pC194 transformierten Klonen. Alle Transformanten besitzen eine zusätzliche Plasmid-Bande, die in der Größe dem Plasmid pBC16 bzw. pC194 entspricht.

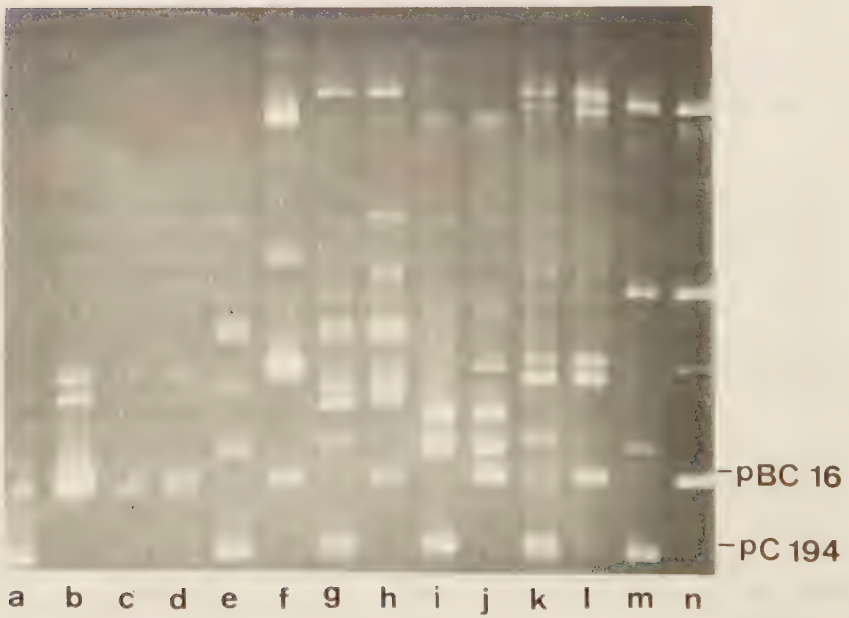

Abb.8: Agarose-Gelelektrophorese von Plasmid-DNA aus transformierten Klonen.

a pC194 (3.3.2.) b pBC16 (3.3.2.) c B.c.DSM 351 pC194
d B.C.DSM 351 pBC16 e B.C.UM10 pC194 f VIII/84 pBC16
g HD-73 30 pC194 h HD-73 30 pBC16 i 60A pC194
j 60A pBC16 k PG-14 pC194 l PG-14 pBC16
m BI 256-82 pC194 n BI 256-82 pBC16

3.4. Fusion

Die Zellfusion ist die einzige genetische Methode, bei der eine bidirektionale Übertragung von genetischer Information erreicht wird. In allen anderen Systemen (Transformation, Transduktion und Konjugation) ist der Gentransfer unidirektional, d.h. es wird DNA von einem Stamm in einen anderen übertragen. Das primäre Fusionsprodukt ist eine diploide Zelle in der die Gesamt-DNA aus beiden Elternstämmen vorhanden ist. Da man annehmen kann, daß die Plasmide zufällig im Cytoplasma verteilt sind, müßten nach der Segregation in stabile haploide Zellen auch Mischungen der Plasmide aus beiden Eltern vorliegen. Man müßte deshalb auch mit hoher Wahrscheinlichkeit Klone finden, bei denen die Fähigkeit zur Kristallbildung von einem Elter in den anderen übertragen worden ist.

3.4.1. Erste Versuche zur Protoplastenfusion von Bacillus thuringiensis

Als Einstieg wurde die Fusion von auxotrophen Mutanten von B.t.thuringiensis HD-2 untersucht (Spontanreversionsrate $<10^{-6}$). Dabei konnte die Fusion durch das Auftreten von prototrophen Kolonien, d.h. durch die Rekombination von auxotrophen Markern gemessen werden. Die Fusion wurde, wie bei Schaeffer et al. (1976) für B.subtilis beschrieben, durchgeführt. Da die Protoplasten nur auf einem sehr komplexen Medium regenerieren, war eine direkte Selektion von prototrophen Klonen nicht möglich. Die Protoplasten wurden nach der Fusion deshalb zuerst auf R-Medium regeneriert und anschließend auf Minimalmedium (M4) überstempelt. Tabelle 15 zeigt das Ergebnis eines solchen Versuches.

Tab.15: Fusion von HD-2 D6 (met^-, pur^+) mit HD-2 D10 (met^+, pur^-). Die Regenerationsplatten (R) wurden nach 5 Tagen Inkubation bei 27° C auf Minimalmediumplatten (M4) überstempelt.

Verdünnung	Kolonien / Platte		
	HGP	R	M4
10^{-1}	325	zahlreich	0
10^{-2}	34	zahlreich	7
10^{-3}	2	zahlreich	16
10^{-4}	0	65	1
10^{-5}	0	6	0
Zellzahl/ml	$3{,}3 \times 10^3$	$6{,}5 \times 10^5$	
Gesamt-Zellzahl/ml		$> 10^8$	
Fusionsrate		1,5 %	
fusionierte Kolonien/Platte		16	

Mehr als 1 % der Kolonien auf den Regenerationsplatten waren prototroph. Diese Klone waren auch nach Kultur unter nichtselektiven Bedingungen (Komplexmedium) stabil. Der Versuch zeigt aber auch die Probleme bei der indirekten Selektion von fusionierten Zellen. Prototrophe Kolonien konnten nur auf Regenerationsplatten nachgewiesen werden, auf denen keine oder nur wenige nicht-protoplastierte Kolonien wuchsen. Dies bedeutet, daß auch die Verdünnungsstufe einen sehr großen Einfluß auf die Anzahl an fusionierten Kolonien hat. Bei einer geringen Regeneration von Protoplasten werden außerdem pro Versuch nur wenige Fusionsprodukte gefunden.

Die Hemmung der Regeneration von fusionierten Protoplasten durch vegetative Zellen macht eine aussagekräftige Angabe der Fusionsrate sehr schwierig. Für die Messung der Fusion wurden deshalb immer zwei Werte benutzt: Die Fusionsrate,

definiert als Zellzahl an fusionierten Kolonien / Zellzahl auf Regenerationsmedium und die maximale Anzahl an fusionierten Kolonien pro Regenerationsplatte. Diese Angaben beziehen sich jeweils auf die optimale Verdünnungsstufe.

Zum Nachweis der Protoplastenfusion wurden einige Kontrollversuche durchgeführt. So wurden Protoplasten der beiden Ausgangsstämme (HD-2 D6 und HD-2 D10) getrennt mit PEG inkubiert und wie in 2.7.1. beschrieben weiterbehandelt. Außerdem wurden die Elternstämme auch zusammen ohne PEG inkubiert. In diesen Versuchen konnten keine prototrophen Kolonien entdeckt werden. Dies zeigt, daß die prototrophen Klone durch eine PEG-induzierte Fusion und Rekombination entstanden sind.

3.4.2. Selektionssystem zum Nachweis von Plasmidübertragung und Rekombination

Der Transfer von Kristallplasmiden war das wichtigste Ziel der Fusionsversuche. Es wurde daher ein Selektionssystem gesucht, mit dem die Übertragung von Plasmiden und die Rekombination von chromosomalen Genen untersucht werden kann. Zum Nachweis der Plasmidübertragung wurde immer ein Tc-resistenter Stamm (Plasmid pBC16) mit einem Str-resistenten Stamm (chromosomale Resistenz) fusioniert. Eine Plasmidübertragung war damit sehr einfach durch die Selektion von Tetracyclin und Streptomycin-resistenten Kolonien nachweisbar. Diese fusionierten Klone konnten anschließend auf den Cotransfer von Kristallplasmiden und die Rekombination von chromosomalen Genen untersucht werden. Um die Selektion zu vereinfachen, wurden zuerst Fusionen von kristallbildenden cry^+-Donorstämmen mit apathogenen cry^--Rezipientenstämmen durchgeführt. Als Rezipienten dienten zwei Stämme: Eine spontane Str-resistente Mutante von B.cereus NRRL 569 UM7

(B.c. UM7-1: his$^-$, Str^r, cry$^-$) und die B.t.thuringiensis Mutante HD-2 D6-4 (met$^-$, Str^r, cry$^-$). Diese Mutante konnte aus HD-2 D6 (met$^-$, pBC16, cry$^+$) durch Plasmidcuring und spontaner Selektion einer Streptomycin-resistenten Kolonie gewonnen werden. Das Plasmid pBC16 wurde durch Protoplastentransformation (2.6.) oder Konjugation (2.8.) in die verwendeten Donorstämme transferiert.

3.4.3. Versuch der direkten Selektion

In 3.4.1. sind die Probleme der indirekten Selektion von fusionierten Zellen gezeigt worden. Da die Protoplasten nur auf komplexen Medien regenerieren, konnte in diesen Versuchen keine direkte Selektion durchgeführt werden. Mit dem in 3.4.2. gezeigten Selektionssystem ist aber eine direkte Selektion (Str^r, Tc^r Kolonien) sehr einfach möglich. Es wurde deshalb die direkte Selektion im Vergleich zur indirekten Selektion untersucht. Dazu wurden die Mutanten HD-2 D6-4 (met$^-$, Str^r, cry$^-$) und HD-2 D10 (pur$^-$, pBC16, cry$^+$) fusioniert und anschließend auf Regenerationsmedium mit verschiedenen Antibiotika ausgesät. Tabelle 16 zeigt, daß eine direkte Selektion (RSTC1) von fusionierten Protoplasten nicht möglich ist. Schon die Selektion auf einen Elternstamm (RSC1 -> HD-2 D6-4) ergab eine wesentlich geringere Übertragung des Plasmids pBC16. In diesen Str^r, Tc^r Kolonien war aber im Gegensatz zur indirekten Selektion keine Rekombination und nur eine sehr geringe Übertragung der Kristallbildung nachweisbar.

Die auf RSTC1 gefundenen Kolonien sind nicht durch Transformation von pBC16 (lysierte Protoplasten) erklärbar, da nach der Transformation zuerst eine Expression der Resistenz notwendig ist (3.3.7.5.). Die Protoplasten wurden nach der Fusion aber sofort verdünnt und plattiert.

Tab.16: Versuch zur direkten Selektion von fusionierten Klonen nach der Fusion von HD-2 D6-4 (met^-, Str^r, cry^-) mit HD-2 D10 (pur^-, Tc^r, cry^+)

Regenerationsmedium	RC1	RSC1	RSTC1
100 ug/ml Streptomycin	-	+	+
15 ug/ml Tetracyclin	-	-	+
Zellzahl	8×10^5	6×10^5	3×10^2
Replica-plating[1]			
% Str^r, Tc^r Kolonien	2,6	0,4	0,05
% Prototrophe Kolonien	1,5	0	0
Kristallbildung von Str^r,Tc^r Kolonien in %[2]	85	5	0

1) Die Regenerationsplatten wurden nach 6 Tagen Inkubation bei 27° C auf Selektionsmedium überstempelt. Die angegebenen %-Zahlen beziehen sich auf die Zellzahl auf RC1-Medium.

2) Je 20 der erhaltenen Str^r, Tc^r Kolonien wurden nach der Sporulation im Phasenkontrastmikroskop auf Kristallbildung untersucht.

3.4.4. Fusionen mit Mutanten des gleichen Ausgangsstammes

In den folgenden Versuchen wurde die Fusion von verschiedenen auxotrophen Mutanten von HD-2 oder B.cereus NRRL 569 untersucht. In allen Versuchen konnten bei der optimalen Verdünnungsstufe mehr als 100 fusionierte Kolonien/Regenerationsplatte erhalten werden. Die Regeneration der Protoplasten wurde bei der Fusion von HD-2 Mutanten auf RC1 und bei der Fusion von B.cereus Mutanten auf RC2 durchgeführt. Einige der erhaltenen Str^r, Tc^r Kolonien wurden anschließend auf ihre chromosomalen Marker und auf Kristallbildung untersucht. Die Ergebnisse eines solchen Fusionsversuches sind in der Tabelle 17 dargestellt.

Tab.17: Beispiel eines Fusionsversuches (Fusion F3)

Eltern: HD-2 D6-4: met^-, arg^+, Str^r, Tc^s, cry^-
HD-2 D12 : met^+, arg^-, Str^s, Tc^r, cry^+

Fusionsrate: Tc^r,Str^r Kolonien: 2 %
Prototrophe Kolonien: 1,2 %

Phenotypische Charakterisierung von Tc^r,Str^r Klonen:

met	arg	cry	Anzahl	= %	
+	+	+	40	48,8	
+	+	-	1	1,2	
+	-	+	8	9,8	
-	+	+	21	25,6	
-	+	-	2	2,4	
-	+	-	1	1,2	spo^-
-	-	+	8	9,8	
-	-	-	1	1,2	
			82	100,0	

Nach der Fusion traten nahezu alle denkbaren Merkmalskombinationen auf. Dies zeigt die Eignung des gewählten Selektionssystems für die Messung der Protoplastenfusion in B.thuringiensis. Auffällig war die hohe Rekombinationsrate (50% prototrophe Kolonien) und der große Anteil an kristallbildenden Kolonien (94%). Das Auftreten von doppelt-auxotrophen Mutanten bestätigt außerdem, daß die erhaltenen Fusionsprodukte wirklich stabile rekombinierte haploide Klone sind. Die weiteren durchgeführten Fusionsversuche sind in der Tabelle 18 zusammengefaßt. Auch hier wurden die selben Ergebnisse erzielt. Die Rekombinationsrate nach der Fusion von B.cereus NRRL 569 Mutanten war allerdings deutlich niedriger (10%), als nach der Fusion von HD-2 Mutanten (40-57%).

Tab.18: Zusammenstellung von weiteren isogenetischen Fusionsversuchen. Fusionierte Zellen wurden durch Selektion von Tc^r,Str^r Kolonien nachgewiesen.

Fusion	F1	F2	F21
"Donor"	HD-2 D10	HD-2 D11	B.c. UM10
Marker	pur^-,Tc^r,cry^+	lys^-,Tc^r,cry^+	trp^-,Tc^r
"Rezipient"	HD-2 D6-4	HD-2 D6-4	B.c. UM7-1
Marker	met^-,Str^r,cry^-	met^-,Str^r,cry^-	his^-,Str^r
Fusionsrate in %	4,1	3,1	6
untersuchte Klone	76	73	68
prototroph (%)	56,6	39,7	10,3
cry^+ (%)	89,3	94,6	-

3.4.5. Fusion von verschiedenen Ausgangsstämmen

3.4.5.1. Fusionen mit HD-2 D6-4 als Rezipient

Die Fusion von B.t.thuringiensis HD-2 D6-4 (met^-, his^+, Str^r, Tc^s, cry^-) mit B.t.tenebrionis BI 256-82 (met^+, his^-, Str^s, Tc^r, cry^+) soll als Beispiel näher beschrieben werden (F32). Diese Stämme sind schon auf Grund ihrer Koloniemorphologie auf HGP-Medium sehr gut unterscheidbar. Nach der Fusion und indirekten Selektion konnten nur 31 Tc^r,Str^r Kolonien erhalten werden (Fusionsrate: 0,1%; 2 fusionierte Klone/Platte), die alle den Auxotrophiemarker des Rezipienten (met^-, his^+) trugen. Einer dieser Klone (F32-13) bildet während der Sporulation das typische plättchenförmige Pathotyp C Kristall des Donorstammes und zeigt außerdem die für HD-2 charakteristische Koloniemorphologie (Abb.9). Die Fähigkeit zur Delta-Endotoxin Bildung ist also durch Protoplastenfusion von BI 256-82 in HD-2 D6-4 übertragen worden.

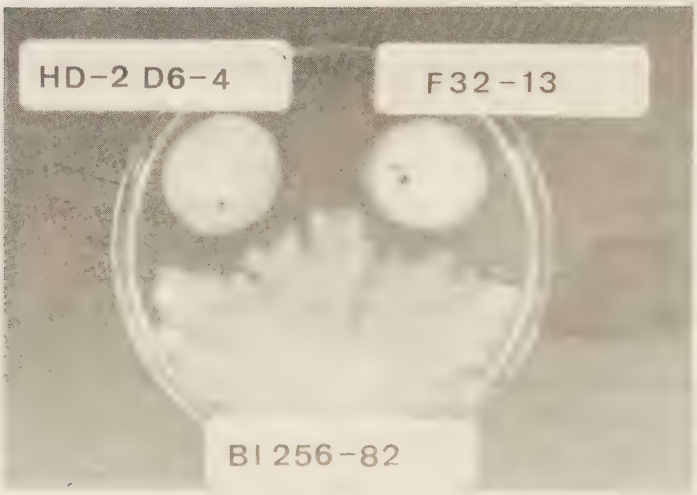

Abb.9: Koloniemorphologie von Elternstämmen und cry^+ Fusiont der Fusion F32.

HD-2 D6-4 (cry^-) ist ein ursprünglich schmetterlingspathogenener Stamm (Pathotyp A). Die Fusionen mit verschiedenen Mutanten von HD-2 ergaben eine hohe Rekombination von auxotrophen Marken und eine hohe Übertragung der Kristallbildung (3.4.4.). In einem weiteren Versuch wurde daher die Fusion von F32-13 (met^-, pur^+, cry^+ ten) mit HD-2 D10 (met^+, pur^-, cry^+ HD-2) untersucht. Es wurden also 2 HD-2 Mutanten mit verschiedener Kristallbildung fusioniert. Da in beiden Ausgangsstämmen das Plasmid pBC16 vorhanden war, wurde direkt auf prototrophe Kolonien (M4-Medium) selektiert. Wie erwartet, wurde eine große Zahl an rekombinierten Kolonien gefunden (>100 prototrophe Kolonien/Platte; Fusionsrate 0,7%). 76 dieser Kolonien wurden nach der Sporulation im Phasenkontrast-Mikroskop auf Kristallbildung überprüft. Von diesen Klonen bildeten 20 das typische rhombische Pathotyp A Kristall und 6 das Pathotyp C Kristall. In 50 Kolonien (65,8%) waren aber beide Kristalle sichtbar. Durch Fusion wurden

Stämme konstruiert, die verschiedene Delta-Endotoxine bilden. Diese Klone sind aktiv gegen Schmetterlinge und Käfer (pers. Mitteilung W.Krieg). Sporulierte Kulturen der verschiedenen HD-2 Varianten sind in Abb.10 gezeigt.

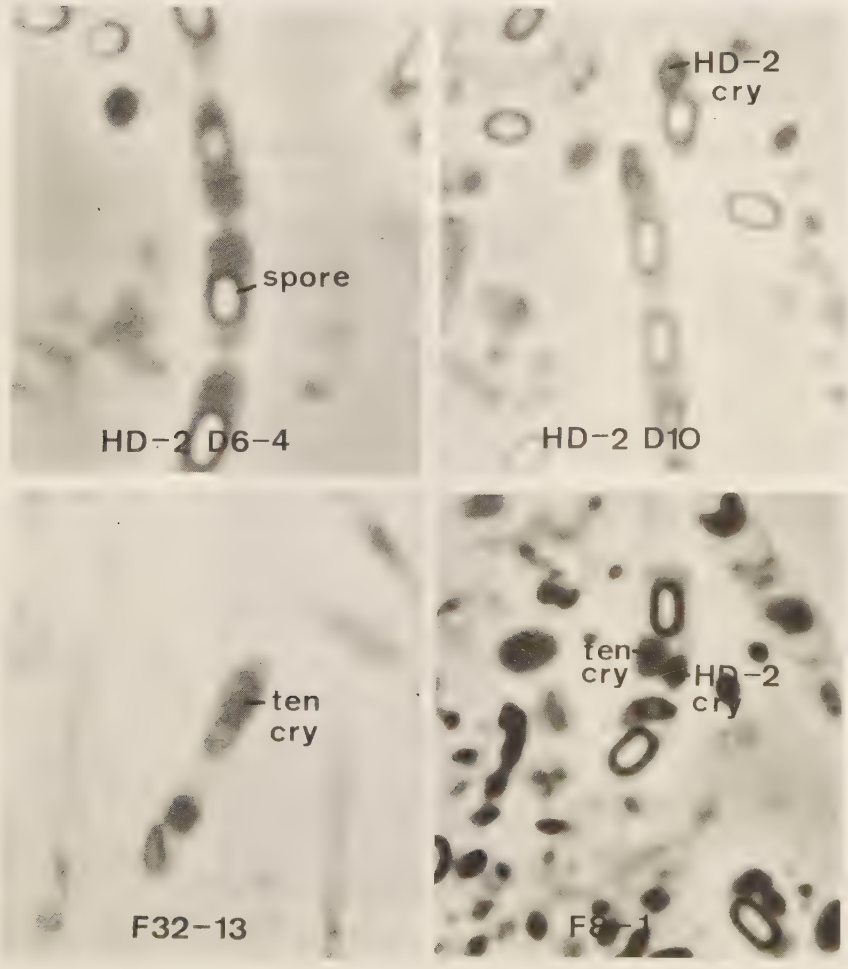

Abb.10: Phasenkontrast-Mikroskopische Aufnahmen von HD-2 Varianten mit verschiedener Kristallbildung.

Die Übertragung von Plasmiden durch Protoplastenfusion ist in Abb.11 dargestellt. BI 256-82 pBC16 enthält 3 Plamide mit ungefähr 2,8 (pBC16), 9 und 40 Md. Im fusionierten Klon F32-13 sind neben den HD-2 D6-4 Plasmiden (5,2; 6,2; 7,2 und ca. 55 Md) noch zwei weitere Plasmidbanden sichtbar, die in der Größe dem Plasmid pBC16 und dem 40 Md-Plasmid aus BI 256-82 entsprechen. In einem Klon mit Pathotyp A und C Kristall (F8-1) ist zusätzlich noch das 30 Md-Plasmid aus HD-2 D10 erkennbar.

1 HD-2 D6-4
2 BI 256-82 pBC16
3 F32-13
4 HD-2 D10
5 F8-1

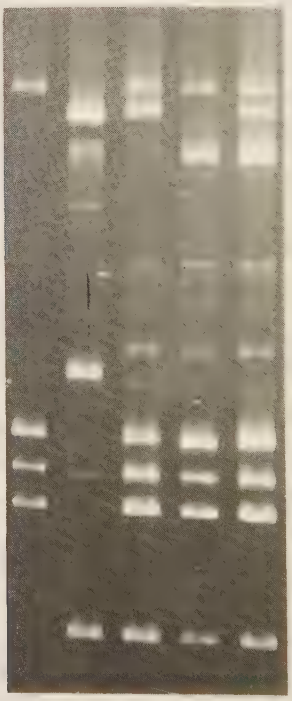

Abb.11: Gesamt-Plasmid DNA von Elternstämmen und fusionierten Kolonien der Fusionen F32 und F8.

Zwei weitere Fusionen sind in Tab.19 kurz zusammengefaßt. Der B.t.galleriae Stamm HD-8 k4-3 (pBC16; pC194) konnte nach der Konjugation von HD-8 pC194 mit HD-2 D10 (pBC16) erhalten werden (Abb.12). Auch in diesen Versuchen waren die gefundenen Tc^r, Str^r Klone immer auxotroph für den Marker des Rezipienten, und ein Teil dieser Kolonien war auch cry^+ (5 bzw. 2 %).

Tab.19: Zusammenstellung von weiteren Fusionsversuchen mit HD-2 D6-4 als Rezipient.

a) Fusion F6:

Eltern: HD-2 D6-4: met^-, arg^+, Str^r, Tc^s, cry^-
HD-73 30 pBC16: met^+, arg^-, Str^s, Tc^r, cry^+

Fusionsrate: 0,5 % Str^r, Tc^r Kolonien
Str^r, Tc^r Kolonien/Platte: 10

Anzahl und Eigenschaften der erhaltenen Klone

met^-, arg^+, Str^r, Tc^r, cry^-	46
met^-, arg^+, Str^r, Tc^r, cry^+	5

b) Fusion F19:

Eltern: HD-2 D6-4: met^-, nic^+, Str^r, Tc^s, cry^-, Cm^s
HD-8 K4-3: met^+, nic^-, Str^s, Tc^r, cry^+, Cm^r

Fusionsrate: 0,4% Str^r, Tc^r Kolonien
Str^r, Tc^r Kolonien/Platte: 10

Anzahl und Eigenschaften der gefundenen Klone:

met^-, nic^+, Str^r, Tc^r, cry^-	53
met^-, nic^+, Str^r, Tc^r, spo^-	2
met^-, nic^+, Str^r, Tc^r, cry^+	2

Die Chloramphenicolresistenz (Plasmid pC194) von Tc^r,Str^r Klonen wurde nicht überprüft.

1 HD-8 k4-3
2 HD-8 pC194
3 HD-2 D10
4 HD-2 k4-2

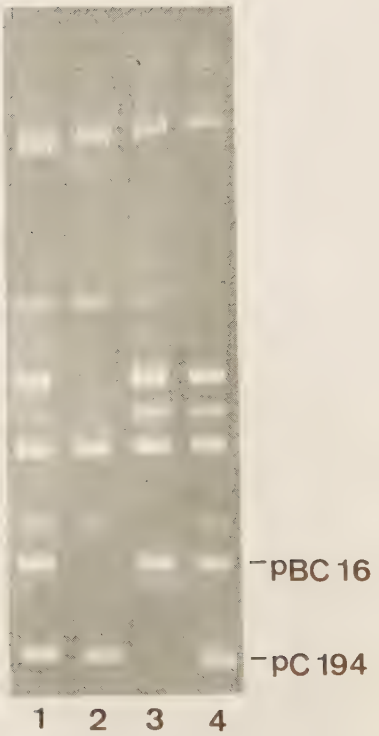

Abb.12: Übertragung von Plasmiden durch Konjugation von HD-8 pC194 mit HD-2 D10 (pBC16). In diesem Versuch konnten Kolonien von beiden Ausgangsstämmen mit den Plasmiden pBC16 und pC194 erhalten werden (Konjugationsrate 10^{-8}). Gezeigt ist die Plasmid-DNA der Ausgangstämme und von je einem Klon mit beiden Plasmiden.

3.4.5.2. Fusionen mit B.cereus NRRL 569 UM7-1 als Rezipient

In der Tabelle 20 sind die Ergebnisse der Fusionen von B.cereus NRRL 569 UM7-1 mit B.t.galleriae HD-8 K4-3 (F12), B.t.thuringiensis HD-2 D6 (F4) und B.t.kurstaki HD-73 30 pBC16 (F10) dargestellt .Bei diesen Fusionen konnten jeweils

nur wenige fusionierte Klone gefunden werden, der Anteil an cry^+ Kolonien war aber sehr hoch (25-70%). Alle gefundenen Str^r, Tc^r Kolonien trugen den Auxotrophiemarker des Rezipienten. Abb.13 zeigt die Plasmidmuster von Elternstämmen und kristallbildenden fusionierten Klonen. Auffällig ist, daß in allen untersuchten fusionierten Stämmen alle Plasmide des Donorstammes enthalten sind. Nur in F12-1 ist das 8 Md-Plasmid aus B.c. UM7-1 nachweisbar.

Tab.20: Eigenschaften von Elternstämmen und fusionierten Str^r, Tc^r Klonen von Fusionen mit B.cereus NRRL 569 UM7-1 als Rezipient.

Eltern/ fusionierte Klone	Marker	Anzahl
a) UM7-1:	his^-, nic^+, Str^r, Tc^s, Cm^s, cry^-	
HD-8 K4-3:	his^+, nic^-, Str^s, Tc^r, Cm^r, cry^+	
F12	his^-, nic^+, Str^r, Tc^r, Cm^r, cry^+	4
	his^-, nic^+, Str^r, Tc^r, Cm^s, cry^+	5
	his^-, nic^+, Str^r, Tc^r, Cm^r, cry^-	2
	his^-, nic^+, Str^r, Tc^r, Cm^s, cry^-	2
b) UM7-1:	his^-, met^+, Str^r, Tc^s, cry^-	
HD-2 D6:	his^+, met^-, Str^s, Tc^r, cry^+	
F4	his^-, met^+, Str^r, Tc^r, cry^+	3
	his^-, met^+, Str^r, Tc^r, cry^-	2
c) UM7-1:	his^-, arg^+, Str^r, Tc^s, cry^-	
HD-73 30 pBC16:	his^+, arg^-, Str^s, Tc^r, cry^+	
F10	his^-, arg^+, Str^r, Tc^r, cry^+	2
	his^-, arg^+, Str^r, Tc^r, cry^-	6

3.4.5.3. Versuche zur Fusion von B.t.israelensis

Um das ganze Spektrum an Pathotypen zu untersuchen, wurden auch Fusionen mit Mutanten von B.t.israelensis Stamm 60A mit HD-2 D6-4 und B.c. UM7-1 nach dem in 3.4.2. gezeigten Selektionsschema durchgeführt. In diesen Versuchen konnten aber keine fusionierten Str^r, Tc^r Klone gefunden werden.

1 HD-8 k4-3
2 F12-1
3 B.c.UM7-1
4 HD-2 D6
5 F4-3
6 B.c.UM7-1
7 F10-6
8 HD-73 30 pBC16

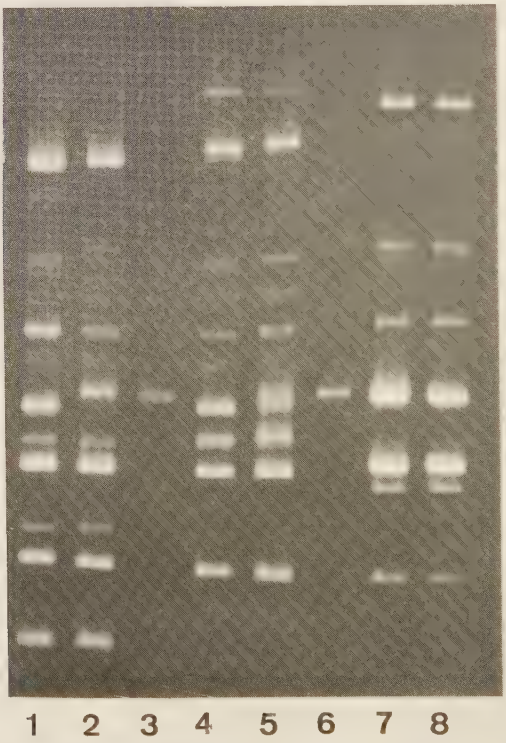

Abb.13: Agarosegel von Plasmiden aus Elternstämmen und cry^+ Fusionten der Fusionen F10, F4 und F12

4. DISKUSSION

4.1. Protoplastierung und Regeneration

Der Abbau der Zellwand wird in den meisten Bakterien durch die Zugabe von Lysozym oder anderen Murein-Hydrolasen erreicht. Da die Zellwand von B.thuringiensis sehr resistent gegen Lysozym ist (Kingan und Ensign 1968), konnten in bisherigen Publikationen zur Protoplastentransformation und Fusion mit diesem Enzym nur Protoplastierungsraten von höchstens 99% erreicht werden. In diesen Arbeiten konnte jedoch die Regeneration von B.t.-Protoplasten nicht eindeutig nachgewiesen werden. Ein Grund für die Lysozymresistenz ist der hohe Anteil an Glucosamin im Murein-Sacculus (Hayashi et al. 1973). Er kommt durch die enzymatische Deacetylierung von N-Acetyl-Glucosamin zustande (Araki et al. 1971).

Um eine bessere Protoplastierung zu erreichen, sollten zu Beginn der Diplomarbeit lysozymsensitive Mutanten selektiert werden. Es zeigte sich aber bald, daß mit dem gewählten Selektionsschema eine Induktion von Autolyseenzymen erfolgte. Nach Optimierung der Anzucht- und Protoplastierungsbedingungen konnte durch Induktion der Autolyse eine sehr gute Protoplastierung (10^{-3} - 10^{-6}) bei allen untersuchten B.t. und B.c. Stämmen erreicht werden. Die Autolyse von B.cereus in Tris-Puffer mit einem pH-Optimum bei 7,5 ist schon von Mohan et al. (1965) beschrieben worden. In dieser Arbeit war eine optimale Autolyse aber nur zu Beginn der log-Phase möglich. Außerdem konnten stabile Protoplasten nur durch die Zugabe von PEG (20%) erhalten werden.

Es wurden zwei weitere Protoplastierungsmethoden verwendet, bei denen keine Autolyseaktivität auftritt. Bei der Protoplastierung mit MML werden die Zellen in einem osmotisch

nicht stabilisierten Puffer mit hohen Lysozymkonzentrationen (5 mg/ml) inkubiert. Die Grundlage der Protoplastierung in SMMP M/L ist dagegen der synergistische Effekt der Mutanolysin- und Lysozymwirkung. Mit diesen Methoden werden nur Protoplastierungsraten bis 10^{-2} erreicht. Auffällig sind dabei die großen Unterschiede bei der Protoplastierung von verschiedenen Stämmen. Regenerationsversuche mit den verschiedenen Protoplastierungsmethoden haben gezeigt, daß ohne Autolysewirkung (MML und SMMP M/L) nur eine geringe Verbesserung der meßbaren Regeneration erreicht werden kann. Die Protoplastierung mit SMMP M/L ergab aber eine 10-fach höhere Transformationsrate.

Die Regeneration von Protoplasten wird durch Plattieren auf geeignete feste Medien (Oberflächenverfahren; Schaeffer et al. 1976) oder durch Eingießen in einen Topagar (Agar-Softlayer-Verfahren; Fodor und Alföldi 1976)) erreicht. Ein wichtiger Punkt ist dabei die Zugabe von hohen Konzentrationen einer osmotisch wirksamen Substanz zur Stabilisierung der Protoplasten. Eine Neubildung der Zellwand wird in den meisten Fällen nur auf sehr komplexen Medien erreicht, nur sehr wenige Bakterien regenerieren auf definierten Medien (z.B. Bacillus megaterium; Fodor et al. 1975). Zur Stimulierung der Regeneration ist in vielen gram-positiven Bakterien außerdem die Zugabe von hochmolekularen Substanzen notwendig. Beschrieben wurden hier vor allem Gelatine (Okamoto et al. 1983), Rinderserumalbumin (Chang und Cohen 1979), Stärke (Stahl und Patte 1983), Polyvinylpyrrolidon (Akamatsu und Sekiguchi 1981), autoklavierte Zellen und isolierte Zellwände (Clive und Landman 1970).
In Bacillus thuringiensis konnte auf komplexen Medien mit Saccharose zur osmotischen Stabilisierung keine Regeneration nachgewiesen werden. Auch die Zugabe der oben genannten Induktoren der Regeneration ergab keine meßbare Regeneration. Erst eine Kombination von hohen Konzentrationen von Gelatine, Stärke und Agar führte zu einer sichtbaren Regeneration. Wichtig für die Regeneration ist die Qualität der

verwendeten Medienbestandteile.So führten verschiedene Chargen von Gelatine bzw. Stärke desselben Herstellers zu einer sehr unterschiedlichen Regeneration. Unterschiedliche Regenerationsraten durch Verwendung von verschiedenen Gelatine Präparaten sind schon von King und Gooder (1970) bei Streptococcen beschrieben worden. Die Funktion von Agar, Gelatine und Stärke für die Regeneration ist nicht eindeutig erklärbar. Landman et al. (1968) konnten in einem 25% Gelatine Medium eine deutliche Verbesserung der Regeneration von B.subtilis erreichen. Sie haben diesen Effekt als eine Art der Immobilisierung von Protoplasten erklärt, wodurch die Diffusion für die Zellwandsynthese wichtiger extracellulärer Produkte (Zellwandaufbauende Enzyme oder kurze schon gebildete Zellwandfragmente) deutlich vermindert wird. Auch De-Castro-Costa und Landman (1977) haben die verminderte Diffusion als wesentliche Funktion der Gelatine beschrieben. Sie haben jedoch eine von der Zelldichte abhängige Hemmung der Regeneration gefunden, und konnten ein Protein (RIF = reversion inhibitor factor) charakterisieren, das für diese Hemmung verantwortlich war. Dieser RIF-Faktor war durch Gelatine hemmbar und zeigte eine deutliche Übereinstimmung mit Autolyseaktivitäten in B.subtilis. Der Einfluß von Autolyseenzymen auf die Regeneration ist auch durch Screening von Mutanten mit verbesserter Regeneration gezeigt worden (Akamatsu und Sekiguchi 1983). Charakteristisch für diese Mutanten war eine deutlich geringere Autolyseaktivität.

Durch die Zugabe von geringen Chloramphenicolkonzentrationen zum Regenerationsmedium wurde eine deutliche Stimulierung der Regeneration erzielt. Das erste sichtbare Resultat der Chloramphenicolzugabe war eine deutliche Verlangsamung des Wachstums von nicht-protoplastierten Zellen. Die ersten Fusionsversuche haben gezeigt, daß vegetative Kolonien die Regeneration von Protoplasten verhindern.Ein Teil der Chloramphenicolwirkung ist daher durch die Hemmung des Wachstums von vegetativen Zellen erklärbar. Chung (1967) hat die Zellwandbildung von B.cereus in Gegenwart von Chloramphenicol

untersucht. Auch bei vollständiger Hemmung der Translation war eine Zellwandsynthese möglich. In autoradiographischen Versuchen mit markiertem ^{3}H-Alanin war ohne Chloramphenicol nur an wenigen Stellen eine Mureinsynthese sichtbar. Dagegen erfolgte mit Chloramphenicol die Neubildung der Zellwand an sehr vielen Punkten, die über die ganze Zelle verteilt waren.

Die Regeneration ist der limitierende Faktor für die Transformation und Fusion. Bei optimierten Bedingungen wurde mit dem Stamm HD-2 D6-4 höchstens eine Regenerationsrate von 10% erreicht, dies ist für Transformations- und Fusionsversuche aber ausreichend. In anderen Stämmen konnten dagegen oft nur wesentlich geringere Regenerationsraten (0,01-0,1%) erzielt werden. Deshalb müßten die Regenerationsbedingungen für diese Stämme verbessert werden. Eine unterschiedliche Regeneration von verschiedenen Stämmen bei gleichen Regenerationsbedingungen ist in vielen gram-positiven Bakterien beobachtet worden (z.B. Fujita et al. 1983).

4.2. Transformation

Chang und Cohen (1979) haben ein sehr effizientes Protoplastentransformationssystem bei B.subtilis beschrieben. Mehrere Arbeitsgruppen versuchten mit dieser Methode auch B.t. zu transformieren, sie konnten aber jeweils nur sehr wenige Transformanten erhalten. In ersten Arbeiten wurden die geringen Transformationsraten durch die schlechte Protoplastierbarkeit der Zellen mit Lysozym erklärt (Martin et al. 1981; Alikhanian et al. 1981). Miteva et al. (1981) erkannten, daß B.t. Protoplasten nicht auf dem B.subtilis Regenerationsmedium DM-3 regenerieren, und haben die Regeneration deshalb in Flüssigmedium (SMMP) durchgeführt. Unter

diesen Bedingungen konnten aber auch nur sehr geringe Transformationsraten (10^{-6}) erzielt werden, wobei die Regeneration wiederum nicht eindeutig nachweisbar war. Durch Induktion der DNA-Aufnahme mit Hilfe von elektrischen Feldimpulsen (analog der Elektro-Fusion) war der selben Gruppe eine Verbesserung der Transformation möglich (Shivarova et al. 1983). In diesen Versuchen wurden aber sehr hohe Plasmid DNA-Konzentrationen (50 ug) verwendet. In der letzten bisher veröffentlichten Arbeit wurde die Transformation von 13 verschiedenen Stämmen mit dem Chloramphenicol-Plasmid pC194 untersucht (Fischer et al.1984). Nur in 7 Stämmen konnten wenige Transformanten gefunden werden.

In ersten eigenen Versuchen war durch Plattieren auf DM-3 oder durch Inkubation in SMMP keine Regeneration von B.t. Protoplasten sichtbar. Es war deshalb sinnlos, Protoplastentransformationsversuche durchzuführen, ohne überhaupt eine Regeneration nachweisen zu können. Eine indirekte Messung der Regeneration durch den Nachweis von Transformanten ist genauso aussichtslos, solange man nicht die geeigneten Transformationsbedingungen kennt. Die Voraussetzung, um geringe Regenerationen messen zu können, ist jedoch eine sehr gute Protoplastierung der Zellen. Als Vorarbeit für die Transformation mußte deshalb zuerst ein sehr effizientes Protoplastierungssystem (Autolyse) erarbeitet werden, mit dem dann eine Messung und Optimierung der Regeneration möglich war (Medium RC1).

Die Versuche zur Optimierung der PEG-induzierten Transformation ergaben die besten Ergebnisse mit den von Chang und Cohen (1979) für B.subtilis beschriebenen Bedingungen. Unterschiedlich waren aber die notwendigen Selektionsbedingungen. So sind die geeigneten Antibiotikakonzentrationen für B.subtilis und B.t. verschieden (z.B. Chloramphenicol: B.subtilis 20 ug/ml; B.t. 10 ug/ml). Außerdem ist für die Expression der Resistenz in B.t. eine wesentlich längere Inkubationszeit in SMMP notwendig (>4h). Diese Inkubation

kann aber durch Zugabe von geringen Antibiotikakonzentrationen wesentlich verkürzt werden. Die Induzierbarkeit der Resistenz durch kurze Inkubation in geringen Chloramphenicolkonzentrationen ist auch für das Plasmid pC194 gezeigt worden (Horinouchi und Weisblum 1982).

Eine hohe Zelldichte ($>10^9$/ml) hemmt das Wachstum von vegetativen Zellen. Dieser Effekt wurde ausgenutzt, um die Vermehrung von nicht-protoplastierten Zellen während der Inkubation in SMMP zu vermeiden. Die Wachstumshemmung bei hohen Zellkonzentrationen tritt jedoch auch während der Regeneration auf. Nach Aussähen der unverdünnten Protoplastensuspension auf Regenerationsplatten werden geringere Koloniezahlen erreicht, als nach Plattieren der 1/10 Verdünnung. Bei geringen Transformationsraten ist deshalb die Verwendung von verdünnten Protoplastensuspensionen sinnvoller. Auch bei der Fermentation von B.t. werden nur Zellzahlen von 1-5 x 10^9 erzielt (Weisser 1986). Um eine Ausbeutesteigerung zu erreichen, muß der Hemmeffekt daher ausgeschaltet werden. Es sind mehrere Faktoren für die dichteabhängige Hemmung der Vermehrung denkbar. Eine Nährstofflimitierung kann ausgeschlossen werden, da die Zellen nach der Transformation in frischem SMMP resuspendiert werden. Möglich ist aber die Bildung von Wachstumshemmstoffen, die bei einer bestimmten Zelldichte in hemmenden Konzentrationen vorhanden sind. Eine weitere Erklärung sind Zell-Zell Kontakte durch die langen Geißeln.

Nach der Protoplastentransformation von sehr unterschiedlichen Stämmen mit pBC16 und pC194 konnten in allen Versuchen transformierte Zellen mit Transformationsraten zwischen 10^2 und 10^6 Transformanten / ug Plasmid-DNA erhalten werden. Die geringen Transformationsraten einiger Stämme sind wohl im wesentlichen durch die sehr schlechte Regeneration dieser Stämme erklärbar.

4.3. Protoplastenfusion

Die Protoplastentransformation ist eine Weiterentwicklung der PEG-induzierten Protoplastenfusion (Hopwood 1981). Beide Methoden unterscheiden sich vor allem in den notwendigen PEG-Konzentrationen. Nach der Transformation in der optimalen Konzentration (30%) waren im Phasenkontrastmikroskop nur einzelne runde Protoplasten erkennbar. In Anwesenheit von 36% PEG war dagegen eine deutliche Fusion der Protoplasten sichtbar. Noch höhere PEG-Konzentrationen ergaben keine Verbesserung der meßbaren Fusionsrate, da die Regeneration dieser fusionierten Protoplasten deutlich schlechter war.

Bacillus thuringiensis ist vor allem durch die Bildung der insektiziden Delta-Endotoxine interessant. Die Fähigkeit zur Kristallbildung ist in vielen Stämmen plasmidcodiert (Carlton und Gonzalez 1985b; Aronson et al. 1986). Das Ziel der Fusionsversuche war deshalb die Übertragung von Kristallplasmiden. Der Nachweis der Delta-Endotoxin Produktion ist nur durch immunologische Methoden, durch einen Biotest oder durch mikroskopische Überprüfung von sporulierten Kulturen möglich. Ein solcher Plasmidtransfer ist daher nur bei hohen Übertragungsraten auffindbar.
Eine Fusion von Protoplasten war durch die Übertragung des Tetracyclin-Plasmids pBC16 in einen Streptomycin-resistenten Stamm (chromosomale Eigenschaft) nachweisbar. Die so erhaltenen Tc^r, Str^r Kolonien konnten anschließend auf den Cotransfer der Kristallbildung überprüft werden. Um auch die Rekombination von chromosomalen Eigenschaften messen zu können, wurden jeweils zwei einfach auxotrophe Mutanten fusioniert.

Die Fusion von auxotrophen Mutanten ergibt in B.subtilis einen großen Anteil an instabilen prototrophen Kolonien (Sanchez-Rivas et al. 1982). Außerdem sind diploide Zellen, in denen ein Elternchromosom nicht exprimiert wird, beschrieben worden (Hotchkiss und Gabor 1980). In B.t. waren

die untersuchten Fusionsprodukte dagegen stabil. Dies zeigt schon das Auftreten von doppelt auxotrophen Kolonien. Auch die Inkubation von prototrophen Kolonien unter nicht-selektiven Bedingungen (HGP-Medium) ergab keine Veränderung der phenotypischen Eigenschaften.

Nach der Fusion von verschiedenen HD-2 Mutanten traten Kolonien mit fast allen denkbaren Merkmalskombinationen auf. Dies zeigt die Eignung der Protoplastenfusion für die Stammentwicklung von B.t.. Auffällig in diesen Fusionen war die hohe Rekombination und Übertragung des cry^+ Phänotyps. Bei der Fusion von verschiedenen Ausgangstämmen wurde dagegen keine Rekombination der verwendeten auxotrophen Marker beobachtet. Obwohl die Rekombination von Genen auch hier nicht ausgeschlossen werden kann, muß die Rekombinationsrate doch wesentlich geringer sein, als nach der Fusion von isogenetischen Stämmen. Diese unterschiedliche Rekombinationsfähigkeit kann auch zur Identifizierung von Stämmen benutzt werden, wie z.B. die Fusion von F32-13 mit HD-2 D10 (F8; 3.4.5.1.) gezeigt hat.
Nach der Fusion von verschiedenen Stämmen konnten jeweils nur wenige fusionierte Kolonien erhalten werden. Ein Teil dieser Klone (3-70%) bildete aber das Kristall des Donorstammes. Da diese Klone die phänotypischen Eigenschaften des Rezipientenstammes besitzen, ist im wesentlichen wohl nur die Fähigkeit zur Kristallbildung vom Donor in den Rezipienten übertragen worden. Durch Fusion von isogenetischen Stämmen mit verschiedener Delta-Endotoxin Produktion konnten sogar Zellen erhalten werden, die unterschiedliche Kristalle bilden. Nach der Fusion von F32-13 mit HD-2 D10 waren in diesen Zellen zwei unterschiedliche Kristalle (Pathotyp A und C) sichtbar. Die Fusion von Stämmen mit unterschiedlichen Pathotyp A Kristallen (z.B. F6-4 mit HD-2 D10) ergab jedoch Kolonien, in denen nur ein Kristall erkennbar war. Es ist unklar, ob in diesen Zellen ein Mischkristall gebildet wird, oder ob nur ein Gen exprimiert wird. 1983 berichteten auch Klier et al. von Stämmen, die unterschiedliche Delta-

Endotoxine bildeten. Sie transferierten ein in B.subtilis kloniertes Pathotyp A Delta-Endotoxin durch Konjugation in B.thuringiensis var. israelensis. Aufgrund der geringen Übertragungsrate (10^{-7}) waren Klone mit Aktivität gegen Schmetterlinge und Stechmücken aber nur durch direkte Selektion (Chloramphenicolresistenz des Vektorplasmids) auffindbar.

Es sind nur wenige Arbeiten zur Protoplastenfusion von B.t. veröffentlicht worden (Shivarova et al. 1983; Debakov et al. 1984). Im Gegensatz zu den in dieser Arbeit gezeigten Ergebnissen konnten diese Autoren nur die Übertragung von Resistenzplasmiden erreichen. Die Fusion von auxotrophen Mutanten ergab nur instabile prototrophe Klone.

4.4. Ausblick

In dieser Arbeit wurde nur die Transformation von kleinen direkt selektierbaren Resistenzplasmiden untersucht. Die in B.t. interessanten sehr großen Kristallplasmide (30-150 Md) sind jedoch nicht direkt selektierbar. Eine Aufnahme dieser Plasmide ist nur durch die Cotransformation mit geringen Konzentrationen an Resistenzplasmiden auffindbar. Einfacher ist hier sicherlich die Klonierung dieser Gene.
Für die Etablierung eines Klonierungssystems direkt in B.t. bzw. B.c. sind folgende Vorarbeiten sinnvoll: Zuerst muß ein Rezipientenstamm gesucht werden, der möglichst keine eigenen Plasmide besitzt. Dieser Rezipient sollte sehr gut transformierbar sein, und keine weiteren Toxine (z.B ß-Exotoxin) bilden. Ein weiterer wichtiger Punkt ist die Konstruktion von geeigneten Vektorplasmiden. Die Verwendung von B.subtilis Vektoren ist zwar möglich, diese Plasmide sind in B.t. aber sehr instabil. Es ist deshalb besser, kleine B.t.-Plasmide als Vektoren zu verwenden. In diese Plasmide könnten dann Resistenzgene (z.B. CAT-Gen aus pC194) einkloniert werden.

Durch Fusion konnten unterschiedliche Delta-Endotoxine in den gleichen Ausgangsstamm transferiert werden. Verschiedene Delta-Endotoxine könnten daher mit einem optimierten Produktionsstamm hergestellt werden. Dieser Universalproduzent sollte auf billigen Medien zu sehr hohen Zelldichten hochwachsen können. Auch die Konstruktion von Delta-Endotoxinen mit veränderter Spezifität ist denkbar. So könnten neue Delta-Endotoxine durch die Rekombination von zwei unterschiedlichen Kristallgenen entstehen. Außerdem können veränderte Toxine durch gentechnologische Methoden hergestellt werden.

5. ZUSAMMENFASSUNG

Es wurden Methoden zur Protoplastentransformation und Protoplastenfusion von Bacillus thuringiensis und Bacillus cereus entwickelt.

Durch die Induktion von zelleigenen lytischen Enzymen konnten alle untersuchten Stämme mit hohen Raten protoplastiert werden. In einigen Stämmen war eine Protoplastierung auch ohne Autolysewirkung durch die Zugabe von Murein-Hydrolasen (Lysozym und Mutanolysin) möglich.
Hohe Konzentrationen von Gelatine, Stärke und Agar sind die wichtigsten Bestandteile des Regenerationsmediums. In vielen Stämmen konnte die Regeneration durch die Zugabe von geringen Konzentrationen an Chloramphenicol deutlich verbessert werden. Die Regenerationsraten waren in vielen Stämmen noch sehr gering.

Mit optimierten Bedingungen konnten alle untersuchten B.thuringiensis und B.cereus Stämme mit den Plasmiden pBC16 und pC194 transformiert werden, mit Transformationsraten zwischen 10^2 und 10^6 Transformanten / ug Plasmid-DNA. Durch Agarose-Gelelektrophorese von isolierten Plasmiden waren die Resistenzplasmide in den transformierten Zellen nachweisbar.

Fusionierte Klone konnten nur durch indirekte Selektion erhalten werden. Die Fusion von Mutanten des gleichen Ausgangsstammes ergab eine hohe Rekombination von chromosomalen Eigenschaften. Dagegen wurde nach der Fusion von verschiedenen Ausgangsstämmen keine Rekombination der untersuchten auxotrophen Marken gefunden. In diesen Versuchen konnte aber die Fähigkeit zur Kristallbildung von einem Elter in den anderen übertragen werden. Durch Fusion von isogenetischen Stämmen mit verschiedener Delta-Endotoxin Produktion war sogar die Konstruktion von Zellen möglich, in denen zwei unterschiedliche Delta-Endotoxine gebildet werden.

6. L I T E R A T U R

Adang,M.J., Staver,M.J., Rocheleau,T.A., Leighton,J., Barker,R.F. and Thompson,D.V.: Characterized full-length and truncated plasmid clones of the crystal protein of Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki HD-73 and their toxicity to Manduca sexta. Gene 36, 289-300 (1985).

Akamatsu,T. and Sekiguchi,J.: Studies on regeneration media for Bacillus subtilis protoplasts. Agric. Biol. Chem. 45, 2887-2894 (1981).

Akamatsu,T. and Sekiguchi,J.: Properties of regeneration mutants of Bacillus subtilis. FEMS Microbiol. Lett. 20, 425-428 (1983).

Alikhanian,S.I., Rhyabchenko,N.F., Bukanov,N.O. and Sakanyan,V.A.: Transformation of Bacillus thuringiensis subsp. galleriae protoplasts by plasmid pBC16. J. Bacteriol. 146, 7-9 (1981).

Angus,T.: A bacterial toxin paralysing silkworm larvae. Nature 173, 545 (1954).

Araki,Y., Fukuoka,S., Oba,S. and Ito,E.: Enzymatic deacetylation of N-acetylglucosamine residues in Peptidoglycan from Bacillus cereus cell walls. Biochem Biophys. Res. Commun. 45, 751-758 (1971).

Aronson,A.I., Beckman,W. and Dunn,P.: Bacillus thuringiensis and related insect pathogens. Microbiol. Rev. 50, 1-24 (1986).

deBarjac,H.: Identification of H-serotypes of Bacillus thuringiensis. In: Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980. Ed: Burges,H.D.; Academic Press, pp 35-44 (1981).

deBarjac,H. and Bonnefoi,A.: Mise au Point sur la Classification des Bacillus thuringiensis. Entomophaga 18, 5-17 (1973).

Baumann,L., Okamoto,K., Unterman,B., Lynch,M. and Baumann,P.: Phenotypic characterization of Bacillus thuringiensis and Bacillus cereus. J. Invertebr. Pathol. 44, 329-341 (1984).

Bernhard,K.: Plasmide in Bacillus subtilis und Bacillus cereus. Dissertation Universität Würzburg (1977).

Bernhard,K., Schrempf,H. and Goebel,W.: Bacteriocin and antibiotic resistance plasmids in Bacillus cereus and Bacillus subtilis. J. Bacteriol. 133, 897-903 (1978).

Bibb,M.J., Ward,J.M. and Hopwood,D.A.: Transformation of plasmid DNA into Streptomyces at high frequency. Nature 274, 388-400 (1978).

Birnboim,H.C.: A rapid alkaline extraction method for the isolation of plasmid DNA. Methods in Enzymology 100, 243-255 (1983).

Carlton,B.C. and Gonzalez,J.M.: Plasmids and delta-endotoxin production in different subspecies of Bacillus thuringiensis. In: Molecular biology of microbial differentiation Washington, DC. Ed.: Hoch,J.A., Setlow,P.; Am. Soc. Microbiol. pp 246-252 (1985a).

Carlton,B.C. and Gonzalez,J.M.: The genetics and molecular biology of Bacillus thuringiensis. In: The molecular biology of the bacilli, Vol.2. Ed.: Dubnau,D.A.; Academic Press pp 211-249 (1985b).

deCastro-Costa,M.R. and Landman,O.E.: Inhibitory protein controls the reversion of protoplasts and L forms of Bacillus subtilis to the walled state. J. Bacteriol. 129, 678-689 (1977).

Chang,S. and Cohen,S.N.: High frequency transformation of Bacillus subtilis protoplasts by plasmid DNA. Molec. Gen. Genet. 168, 111-115 (1979).

Chung,K.L.: Autoradiographic studies of bacterial cell wall replication: I. Cell wall growth of Bacillus cereus in the presence of Chloramphenicol. Can. J. Microbiol. 13, 341-356 (1967).

Clive,D. and Landman,O.E.: Reversion of Bacillus subtilis protoplasts to the bacillary form induced by exogenous cell walls, bacteria and by growth in membrane filters. J. Gen. Microbiol. 61, 233-243 (1970).

Davidson,E.W. and Sweeney,A.W.: Microbial control of vectors: A decade of progress. J. Med. Entomol. 20, 235-247 (1983).

Debakov,V.G., Azizbekyan,R.R., Stepanov,V.M. and Chestukhina,G.G.: Genetic and biochemical study of Bacillus thuringiensis. In: Genetics and biotechnology of Bacilli. Ed.: Ganesan,A.T. and Hoch,J.A.; Academic Press pp 345-358 (1984)

Ehrlich,S.D.: Replication and expression of plasmids from Staphylococcus aureus in Bacillus subtilis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 74, 1680-1682 (1977).

Fischer,H.-M., Lüthy,P. and Schweitzer,S.: Introduction of plasmid pC194 into Bacillus thuringiensis by protoplast transformation and plasmid transfer. Arch. Microbiol. 139, 213-217 (1984).

Fodor,K. and Alföldi,L.: Fusion of protoplasts of Bacillus megaterium. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 2147-2150 (1976).

Fodor,H., Hadlaczky,G. and Alföldi,L.: Reversion of Bacillus megaterium protoplasts to the bacillary form. J. Bacteriol. 121, 390-391 (1975).

Fujita,Y., Okamoto,T. and Irie,R.: Protoplast formation and regeneration in lactic Streptococci. Agric. Biol. chem. 47, 2103-2105 (1983).

Goldberg,L. and Margalit,J.: A bacterial spore demonstrating rapid larvicidal activity against Anopheles sergentii, Uranotaenia unguiculata, Culex univivatus, Aedes aegypti and Culex pipiens. Mosquito News 37, 355-358 (1977).

Gonzalez,J.M., Brown,b.J. and Carlton,B.C.: Transfer of Bacillus thuringiensis plasmids coding for delta-endotoxin among strains of Bacillus thuringiensis and Bacillus cereus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 6951-6955 (1982).

Gonzalez,J.M., Dulmage,H.T. and Carlton,B.C.: Correlation between specific plasmids and delta-endotoxin production in Bacillus thuringiensis. Plasmid 5, 351-365 (1981).

Hash,J.H.: Purification and properties of Staphylolytic enzymes from Chalaropsis sp.. Arch. Biochem. Biophys. 102, 379-388 (1963).

Hayashi,H., Araki,Y. and Ito,E.: Occurrence of glucosamine residues with free amino groups in cell wall peptidoglycan from Bacilli as a factor responsible for resistance to Lysozyme. J. Bacteriol. 113, 592-598 (1973).

Held,G.A., Bulla,L.A., Farrari,E., Hoch,J., Aronson,A.I. and Minnich,S.A.: Cloning and localization of the lepidopteran protoxin gene of Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 79, 6965-6069 (1982).

Hopwood,D.A.: Genetic studies with bacterial protoplasts. Ann. Rev. Microbiol. 35, 237-272 (1981).

Horinouchi,S. and Weisblum,B.: Nucleotide sequence and functional map of pC194, a plasmid that specifies inducible Chloramphenicol resistance. J. Bacteriol. 150, 815-825 (1982).

Hotchkiss,R.D. and Gabor,M.H.: Biparental products of bacterial protoplast fusion showing unequal parental chromosome expression. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 3553-3557 (1980).

Iizuka,T. and Yamamoto,T.: Possible location of the mosquitocidal protein in the crystal preparation of Bacillus thuringiensis subsp. kurstaki. FEMS Microbiol. Lett. 19, 187-192 (1983).

Kingan,S.L. and Ensign,J.C.: Chemical composition of the cell wall of Bacillus thuringiensis var. thuringiensis. J. Bacteriol. 95, 724-726 (1968).

King,E. and Gooder,H.: Reversion of the streptococcal state of enterococcal protoplasts, sphaeroplasts, and L-forms. J. Bacteriol. 103, 692-696 (1970).

Klier,A., Bourgouin,C. and Rapoport,G.: Mating between Bacillus subtilis and Bacillus thuringiensis and transfer of cloned crystal genes. Mol. Gen. Genet. 191, 257-262 (1983).

Klier,A., Fargette,F., Ribier,J. and Rapoport,G.: Cloning and expression of the crystal protein genes from Bacillus thuringiensis strain berliner 1715. EMBO J. 1, 791-799 (1982).

Krieg,A.: Bekämpfung von Insekten im Pflanzenschutz mit Bacillus thuringiensis Präparaten und deren Einfluß auf die Umwelt; 2. Mitteilung. Anz. Schädlingskde., Pflanzenschutz, Umweltschutz 56, 41-52 (1983).

Krieg,A., Huger,A., Langenbruch,G. und Schnetter,W.: Bacillus thuringiensis var. tenebrionis: ein neuer, gegenüber Larven von Coleopteren wirksamer Pathotyp. Z. ang. Ent. 96, 500-508 (1983).

Krieg,A. and Langenbruch,G.A.: Susceptibility of arthropod species to Bacillus thuringiensis. In: Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980. Ed.: Burges,H.D.; Academic Press pp 837-896 (1981).

Kronstad,J.W., Schnepf,H.E. and Whiteley,H.R.: Diversity of locations for the Bacillus thuringiensis crystal protein gene. J. Bacteriol. 154, 419-428 (1983).

Kronstad,J.W. and Whiteley,H.R.: Three classes of homologous crystal protein genes. Gene 43, 29-40 (1986).

Landman,O.E., Ryter,A. and Frehel,C.: Gelatin-induced reversion of protoplasts of Bacillus subtilis to the Bacillary form: Electron-microscopic and physical study. J. Bacteriol. 96, 2154-2170 (1968).

Lereclus,D., Lecadet,M.-M., Ribier,J. and Dedonder,R.: Molecular relationships among the plasmids of Bacillus thuringiensis: conserved sequences through 11 crystalliferous strains. Mol. Gen. Genet. 186, 391-398 (1982).

Lüthy,P. und Wolfersberger,M.G.: Das delta-Endotoxin von Bacillus thuringiensis; Struktur und Wirkungsweise. Swiss Biotech. 4, Nr.1a, 18-20 (1986).

Martin,P.A.W., Lohr,J.R. and Dean,D.H.: Transformation of Bacillus thuringiensis protoplasts by plasmid deoxyribonucleic acid. J. Bacteriol. 145, 980-983 (1981).

McLinden,J.H., Sabourin,J.R., Clark,B.D., Gensler,D.R., Workman,W.E. and Dean,D.H.: Cloning and expression of an insecticidal k-73 type crystal protein gene from Bacillus thuringiensis var. kurstaki into Escherichia coli. Appl. Environ. Microbiol. 50, 623-628 (1985).

Miteva,V.I., Shivarova,N.I. and Grigorova,R.T.: Transformation of Bacillus thuringiensis protoplasts by plasmid DNA. FEMS Microbiol. Lett. 12, 253-256 (1981).

Mohan,R.R., Kronish,D.P., Pianotti,R.S., Epstein,R.L. and Schwartz,B.S.: Autolytic mechanism for sphaeroblast formation in Bacillus cereus and Escherichia coli. J. Bacteriol. 90, 1355-1363 (1965).

Nickerson,K.W. and Bulla,L.A.: Physiology of sporeforming bacteria associated with insects: Minimal nutritional requirements for growth, sporulation and parasporal crystal formation of Bacillus thuringiensis. Appl. Microbiol. 28, 124-128 (1974).

Ohba,M. and Aizawa,K.: Frequency of acrystalliferous spore-forming bacteria possessing flagellar antigens of Bacillus thuringiensis. J. Basic. Microbiol. 26, 185-188 (1986).

Okamoto,T., Fujita,Y. and Irie,R.: Protoplast formation and regeneration of Streptococcus lactis cells. Agric. biol. chem. 47, 259-263 (1983).

Ozawa,K. and Iwahana,H.: Involvement of a transmissible plasmid in heat-stable exotoxin and delta-endotoxin production in Bacillus thuringiensis subspecies darmstadiensis. Current Microbiol. 13, 337-340 (1986).

Sanchez-Rivas,C., Levi-Meyrueis,C., Lazard-Monier,F. and Schaeffer,P.: Diploid state of phenotypically recombinant progeny arising after protoplast fusion in Bacillus subtilis. Mol. Gen. Genet. 188, 272-278 (1982).

Schaeffer,P., Cami,B. and Hotchkiss,R.: Fusion of bacterial protoplasts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 73, 2151-2155 (1976).

Schall,D.: Untersuchungen zur Genetik von Bacillus thuringiensis. Diplomarbeit Universität Tübingen (1984).

Schindler,C.A. and Schuchardt,V.T.: Lysostaphin, a new bacteriolytic agent for the Staphylococcus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 51, 414-421 (1964).

Schnepf,H.E. and Whiteley,H.R.: Cloning and expression of the Bacillus thuringiensis crystal protein gene in Escherichia coli. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78, 2893-2897 (1981).

Schnepf,H.E., Wong,H.C. and Whiteley,H.R.: The amino acid sequence of a crystal protein from Bacillus thuringiensis deduced from the DNA base sequence. J. Biol. Chem. 260, 6264-6272 (1985).

Sebesta,K., Farkas,J., Horska,K. and Vankova,J.: Thuringiensin, the beta-exotoxin of Bacillus thuringiensis. In: Microbial control of pests and plant diseases 1970-1980. Ed.: Burges,H.D.; Academic Press pp 249-281 (1981).

Shibano,Y., Yamagata,A., Nakamura,N., Iizuka,T., Sugisaki,H. and Takanami,M.: Nucleotide sequence coding for the insecticidal fragment of the Bacillus thuringiesis crystal protein. Gene 34, 243-251 (1985).

Shivarova,N., Förster,W., Jacob,H.-E. and Grigorova,R.: Microbiological implications of electric field ellects; VII. Stimulation of plasmid transformation of Bacillus cereus protoplasts by electric field pulses. Z. allg. Microbiol. 23, 595-599 (1983).

Shivarova,N., Grigorova,R., Förster,W., Jacob,H.-E. and Berg,H.: Microbiological implications of electric field effects. Part VIII: Fusion of Bacillus thuringiensis protoplasts by high electric field pulses. Bioelectrochem. Bioenerg. 11, 181-185 (1983).

Siegel,J.L., Hurst,S.F., Liberman,E.S., Coleman,S.E. and Bleiweis,A.S.: Mutanolysin-induced spheroplasts of Streptococcus mutans are true protoplasts. Infect. Immun. 31, 808-815 (1981).

Stahl,M.L. and Pattee,P.A.: Computer-assisted chromosome mapping by fusion in Staphylococcus aureus. J. Bacteriol. 154, 395-405 (1983).

Tam,A. and Fitz-James,P.: Plasmids associated with a phage-like particle and with a satellite inclusion in Bacillus thuringiensis ssp. israelensis. Can. J. Microbiol. 32, 382-388 (1986).

Thurley,P., Chilcott,C.N., Kalmakoff,J. and Pillai,J.S.: Characterization of proteolytic activity associated with Bacillus thuringiensis var. darmstadiensis crystals. FEMS Microbiol. Lett. 27, 221-225 (1985).

Tojo,A., Samasanti,W., Yoshida,N. and Aizawa,K.: Effects of the three proteases from gut juice of the silkworm Bombyx mori, on the two morphologically different inclusions of the delta-endotoxin of Bacillus thuringiensis kurstaki HD-1 strain. Agric. Biol. Chem. 50, 575-580 (1985).

Weisser,H.: Stammverbesserung und Fermentation von Bacillus thuringiensis var. israelensis. Dissertation Universität Tübingen (1986).

Yokogawa,K., Kawata,S., Takesmura,T. and Yoshimura,Y.: Purification and properties of lytic enzymes from Streptomyces globisporus 1829. Agric. Biol. Chem. 39, 1533-1543 (1975).

Lebenslauf

Dietmar Schall

28.5.1958	geboren in Kiebingen
1965 - 1968	Volksschule Kiebingen
1968 - 1977	Eugen-Bolz-Gymnasium Rottenburg
7.5.1977	Reifeprüfung
1.7.1977 - 30.9.1978	Wehrdienst
ab WS 1978/79	Biologie-Studium an der Universität Tübingen
22.7.1980	Diplom-Vorprüfung
13.7.1984	Diplomprüfung
ab September 1984	Anfertigung der vorliegenden Dissertation am Institut für Biologie II, Lehrbereich Mikrobiologie I, unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H. Zähner und Herrn Dr. K.Bernhard.

Meine akademischen Lehrer waren:

D. Ammermann, C.-F. Bardele, E. Bayer, W. Bessler, V. Braun, W. Engels, K.G. Grell, J. Guglielmi, K.-P. Hadeler, K.G. Hantke, V. Hemleben, C. Jönsson, G.Jung, O. Klee, W. Löffler, D. Mecke, H. Netzel, F. Oberwinkler, K. Poralla, A. Rieker, E. Sander, B. Schwemmle, H.U. Seitz, W. Seyffert, J. Strähle, M. P. Wenk, G. Winkelmann, K. Wöhrmann, H. Zähner.

Offsetdruck Spengler
Lessingstraße 4 · 7401 Neustetten 1
Telefon (0 74 72) 2 21 45